

# Mezenhimalne matične ili medicinske signalne stanice u imunomodulatornom i regenerativnom liječenju djece

---

Iveković, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:523552>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Barbara Iveković**

**Mezenhimalne matične ili medicinske signalne  
stanice u imunomodulatornom i  
regenerativnom liječenju djece**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2020.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Barbara Iveković**

**Mezenhimalne matične ili medicinske signalne  
stanice u imunomodulatornom i  
regenerativnom liječenju djece**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2020.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom doc.dr.sc. Marija Ćuka i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2019./2020.

**Popis i objašnjenje kratica:**

**MSC** (*engl. Mesenchymal Stem Cell / Medicinal Signaling Cell*) mezenhimalna matična stanica / medicinska signalna stanica

**NK stanica** (*engl. Natural Killer Cell*) stanica prirodna ubojica

**Treg** regulatorni limfocit T

**MHC I** (*engl. Major Histocompatibility Complex I*) glavni sustav tkivne podudarnosti I

**MHC II** (*engl. Major Histocompatibility Complex II*) glavni sustav tkivne podudarnosti II

**PGE2** prostaglandin E2

**IL-4** interleukin 4

**IL-6** interleukin 6

**IL-8** interleukin 8

**IL-10** interleukin 10

**TNF $\alpha$**  (*engl. Tumor necrosis factor  $\alpha$* ) faktor tumorske nekroze  $\alpha$

**TSG-6** (*engl. TNF- $\alpha$  stimulated gene/protein 6*) TNF- $\alpha$  stimulirani gen/protein 6

**IL-1 $\beta$**  interleukin 1 $\beta$

**TGF- $\beta$**  (*engl. Transforming growth factor  $\beta$* ) transformirajući faktor rasta  $\beta$

**IFN $\gamma$**  interferon  $\gamma$

**TLR** (*engl. Toll-like receptor*) receptor sličan proteinu Toll-u

**CXCL12** (*engl. C-X-C motif chemokine ligand 12*) CXC kemokinski ligand 12

**CXCR4** (*engl. C-X-C motif chemokine receptor 4*) CXC kemokinski receptor 4

**CCL2** (*engl. C-C motif chemokine ligand 2*) CC kemokinski ligand 2

**CCR2** (*engl. C-C motif chemokine receptor 2*) CC kemokinski receptor 2

**VCAM-1-VLA-4** (*engl. Vascular cell adhesion molecule 1 – Very late antigen 4 interaction*)

**MMP-2** (*engl. Matrix metalloproteinase 2*) matriks metaloproteinaza 2

**MT-MMP** (*engl. Membrane-type matrix metalloproteinase*) membranski tip matriks metaloproteinaze

**KGF** (*engl. Keratinocyte growth factor*) faktor rasta keratinocita

**SDF-1** (*engl. Stromal cell-derived factor 1*)

**MIP-1a** (*engl. Macrophage inflammatory protein 1alpha*)

**MIP-16** (*engl. Macrophage inflammatory protein 16*)

**STC-1** (*engl. Secretine tumor cell line 1*)

**SFRP2** (*engl. Secreted frizzled-related protein 2*)

**TGF- $\beta$ 1** (*engl. Transforming growth factor  $\beta$ 1*) transformirajući faktor rasta  $\beta$ 1

**TGF- $\alpha$**  (*engl. Transforming growth factor  $\alpha$* ) transformirajući faktor rasta  $\alpha$

**VEGF** (*engl. Vascular endothelial growth factor*) vaskularni endotelni faktor rasta

**HGF** (*engl. Hepatocyte growth factor*) faktor rasta hepatocita

**IGF-1** (*engl. Insulin-like growth factor 1*) faktor rasta sličan inzulinu 1

**FGF-2** (*engl. Fibroblast growth factor 2*) faktor rasta fibroblasta 2

**EGF** (*engl. Epidermal growth factor*) epidermalni faktor rasta

**IL-1RA** (*engl. interleukin-1 receptor antagonist*) antagonist receptora interleukina 1

**IDO** (*engl. Indoleamine 2,3-dioxygenase*) indolamin 2,3-dioksigenaza

**sTNF-R** (*engl. Soluble Tumor necrosis factor receptor*) topljivi receptor faktora tumorske nekroze

**NO** (*engl. Nitric oxide*) dušični oksid

**sHLA-G5** (*engl. Soluble Human leukocyte antigen G5*) topljivi antigen humanih leukocita G5

**LL-37** antimikrobni peptid

**FDA** (*engl. Food and Drug Administration*) Uprava za hranu i lijekove

**aGVHD** (*engl. Acute Graft-versus-host-disease*) akutni oblik reakcije presatka protiv primatelja

**cGVHD** (*engl. Chronic Graft-versus-host-disease*) kronični oblik reakcije presatka protiv primatelja

**MS** multipla skleroza

**ALS** amiotrofna lateralna skleroza

**MPS** mukopolisaharidoza

**GAG** glikozaminoglikani

**BO** bronhiolitis obliterans

**BOS** bronhiolitis obliterans sindrom

**PIBO** postinfektivni bronhiolitis obliterans

**HSCT** (*engl. Hematopoietic stem cell transplantation*) transplantacija krvotvornih matičnih stanica

**CT** (*engl. Computed tomography*) kompjuterizirana tomografija

**FEV1** (*engl. Forced expiratory volume in 1 second*) forsirani ekspiratorni volumen u 1. sekundi

**VC** (*engl. Vital capacity*) vitalni kapacitet



## SADRŽAJ:

### SAŽETAK

### SUMMARY

1.	UVOD .....	1
2.	OSNOVNE KARAKTERISTIKE MEZENHIMALNIH MATIČNIH STANICA .....	3
2.1.	Otkriće MSC .....	3
2.2.	Promjena nomenklature.....	5
2.3.	Periciti kao preteče MSC.....	7
3.	DJELOVANJA MSC.....	8
3.1.	Imunomodulatorno djelovanje .....	8
3.2.	Regenerativni učinak .....	11
4.	TERAPIJSKA PRIMJENA MSC.....	13
5.	REMESTEMCEL-L.....	14
6.	TERAPIJSKE INDIKACIJE .....	14
7.	PRIKAZ BOLESNICE .....	18
8.	ZAKLJUČAK.....	26
9.	ZAHVALE.....	27
10.	POPIS LITERATURE .....	28
11.	ŽIVOTOPIS.....	33

## SAŽETAK

### Mezenhimalne matične ili medicinske signalne stanice u imunomodulatornom i regenerativnom liječenju djece

Barbara Iveković

Mezenhimalne matične stanice (MSC) predstavljaju skupinu multipotentnih stanica izoliranih iz humane koštane srži i periosta, koje *in vitro* zadržavaju sposobnost diferencijacije u brojna tkiva mezodermalnog podrijetla: osteoblaste, hondroblaste, mioblaste, stromalne stanice, fibroblaste i adipocite, pod uvjetima određene stanične kulture. S vremenom se uvidjelo da mogu biti izolirane iz gotovo svih tkiva ljudskog tijela budući da nastaju od pericita, perivaskularnih stanica, te da imaju dodatne karakteristike. *In vivo*, njihova uloga primarno je usmjerena na lučenje bioaktivnih čimbenika koji prepoznaju mjesto ozljede ili upale, posreduju u imunološkom odgovoru, smanjuju upalu i potiču regeneraciju tkiva. Zbog tih svojstava tendencija je promijeniti im ime u medicinske signalne stanice.

Zahvaljujući svojstvima koja su naknadno otkrivena, danas se MSC koriste u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima kao potencijalna terapija brojnih bolesti različitih organskih sustava (npr. za liječenje GVHD-a, infarkta miokarda, astme, bronhopulmonalne displazije, multiple skleroze, osteoartritisa, SLE, transplantacije organa itd.) gdje pokazuju obećavajuće rezultate.

Cilj ovog diplomskog rada jest sakupiti nova saznanja o dobro poznatim stanicama te njihovoj mogućoj primjeni u kliničkoj praksi, što je od velike važnosti za liječenje određenih patoloških stanja, posebice u pedijatrijskoj populaciji.

**KLJUČNE RIJEČI:** mezenhimalne matične stanice, medicinske signalne stanice, imunomodulacija, regeneracija tkiva

## SUMMARY

### **Mesenchymal stem or medicinal signaling cells in immunomodulatory and regenerative treatment of children**

**Barbara Iveković**

Mesenchymal stem cells (MSCs) represent a group of multipotent cells isolated from human bone marrow and periosteum that retain *in vitro* ability to differentiate into various tissues of mesodermal origin: osteoblasts, chondroblasts, myoblasts, stromal cells, fibroblasts and adipocytes, under the conditions of a particular cell culture. Over time, it has become apparent that they can be isolated from almost all tissues of the human body as they arise from pericytes, perivascular cells, and have additional characteristics. *In vivo*, their role is primarily focused on secreting bioactive factors that recognize the site of injury or inflammation, mediate the immune response, reduce inflammation, and promote tissue regeneration. Because of these properties, the tendency is to change their name to medical signaling cells.

Due to the properties discovered, MSCs are used nowadays in preclinical and clinical research as a potential therapy for numerous diseases of different organ systems (e.g. for the treatment of GVHD, myocardial infarction, asthma, bronchopulmonary dysplasia, multiple sclerosis, osteoarthritis, SLE, transplants organs etc.) where they show promising results.

The aim of this thesis is to summarize new knowledge about the well-known cells and their possible application in clinical practice, which is of great importance for the treatment of certain pathological conditions, especially in the pediatric population.

**KEY WORDS: mesenchymal stem cells, medicinal signaling cells, immunomodulation, regeneration of tissue**

## 1. UVOD

Razvojem čovječanstva dolazi do velikih otkrića i u području medicine. To se posebno odnosi na razvoj lijekova i različitih pristupa liječenju bolesti. U novije vrijeme, intenzivno se istražuje i stavlja naglasak na imunoterapiju. Imunoterapija podrazumijeva lijekove koji djeluju na imunološki sustav. Ona obuhvaća imunostimulatore - aktivatore imunološkog sustava, koji potiču organizam domaćina na lučenje protutijela, citokina, čimbenika rasta ili na aktivaciju različitih signalnih mehanizama koji sudjeluju u borbi protiv bolesti (npr. protiv virusa, malignih stanica i sl.) te imunosupresive. Imunosupresijska terapija usredotočuje se na prigušivanje abnormalnog imunološkog odgovora (npr. u autoimunim bolestima, alogenim transplantacijama matičnih stanica ili organa, u borbi protiv malignih stanica i sl.). (1) Trenutno dostupni imunosupresivi, kao što su kortikosteroidi, citostatici (ciklofosamid, azatioprin, metotreksat), ciklosporin, takrolimus, sirolimus i brojni drugi, imaju ogroman utjecaj na porast stope preživljavanja od različitih bolesti, a osobito na poboljšanje autoimunih bolesti te dugoročno preživljavanje nakon transplantacije. Međutim, ti lijekovi povezani su i sa štetnim učincima koji mogu rezultirati značajnim obolijevanjem od raznih bolesti zbog dugotrajne ili doživotne primjene, uključujući alarmantno povećanje incidencije malignih bolesti (2), što svakako treba nastojati izbjeći ili barem umanjiti. Stoga, rješenje bi bila stanična terapija gdje se koristi urođena sposobnost stanica da ulaze u složenu i koordiniranu interakciju s imunološkim sustavom domaćina, izazivajući selektivan i uravnotežen odgovor. (3) Jedna od takvih mogućnosti jest primjena mezenhimalnih matičnih stanica.

Vidimo da danas postoje razne terapijske mogućnosti za liječenje bolesti u kojima je potrebna imunomodulacija. S druge strane, nemamo puno saznanja o dostupnosti

lijekova koji potiču regeneraciju tkiva. Postoje, dakle, još uvijek određena stanja i bolesti u kojima suvremena medicina traži nova rješenja.

Mezenhimalne matične ili medicinske signalne stanice, kao histološka skupina već dobro poznatih stanica, danas su novina u terapiji jer su otkrivene njihove specifične karakteristike koje mnogo obećavaju kada je u pitanju imunomodulatorno i/ili regenerativno liječenje. Potencijal mezenhimalnih matičnih stanica kao terapije posebno je iskoristiv u pedijatrijskoj populaciji, u indikaciji liječenja bolesti gdje postoji potreba za imunomodulacijom, a posebno regeneracijom tkiva. Ponajprije zbog nužnosti dugotrajne primjene, a s ciljem korištenja najučinkovitije terapije uz najmanje nuspojava.

Budući da se radi o potpuno novom terapijskom pristupu, svrha ovog diplomskog rada jest sakupiti sva saznanja o karakteristikama i mogućnostima stanica, čija bi upotreba u kliničkoj praksi uvelike doprinijela terapiji dosad neizlječivih ili teško liječivih stanja, te tako pomogla brojnoj oboljeloj djeci, ali i odraslima.

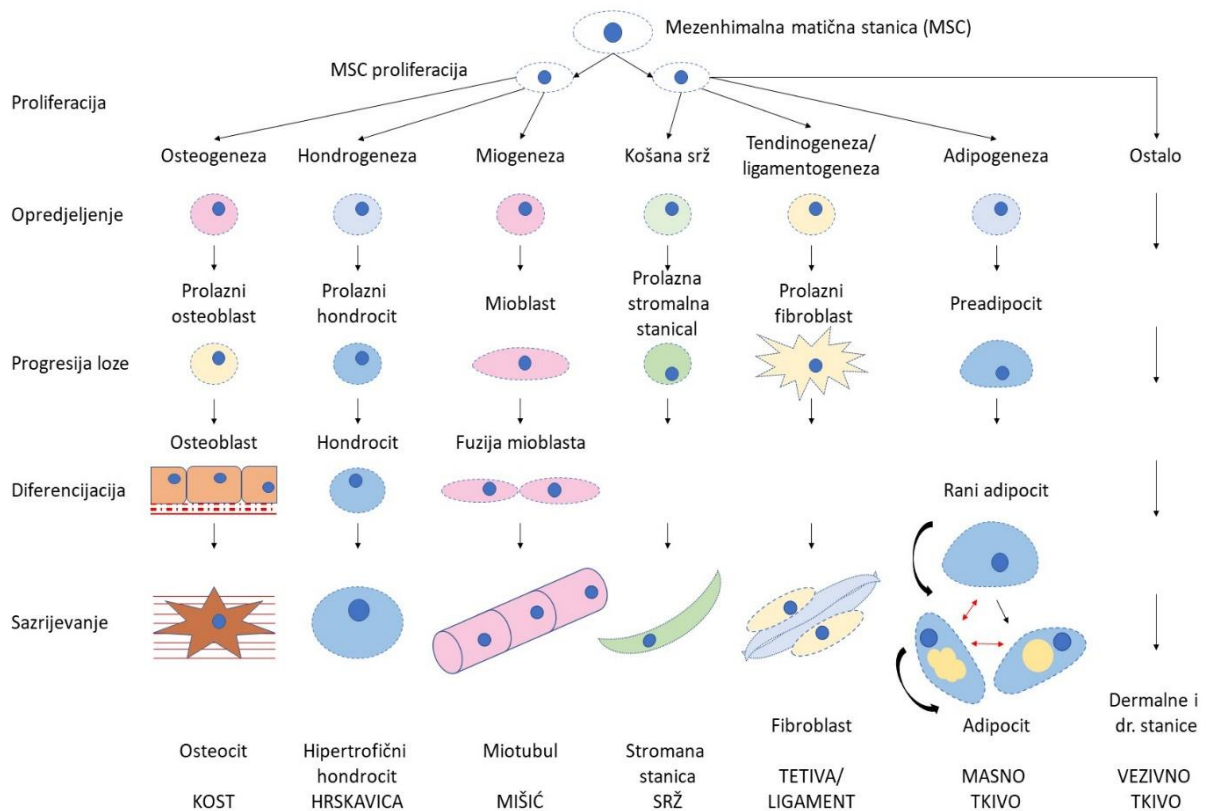
## 2. OSNOVNE KARAKTERISTIKE MEZENHIMALNIH MATIČNIH STANICA

Mezenhimalne matične stanice (MSC) predstavljaju skupinu multipotentnih stanica izoliranih iz humane koštane srži i periosta, koje *in vitro* zadržavaju sposobnost diferencijacije u brojna tkiva mezodermalnog podrijetla. (4) U početku su se pronalazile i u krvi pupkovine, ali u manjim koncentracijama. (5) Imaju potencijal diferencirati se u osteoblaste, hondroblaste, mioblaste, stromalne stanice, fibroblaste i adipocite, pod uvjetima određene stanične kulture. (4) Također, one pripadaju skupini matičnih stanica koje imaju funkciju održavati i popravljati tkivo u kojemu se nalaze. (6) Vjeruje se da su upravo one odgovorne za rast, cijeljenje i zamjenu stanica koje su izgubljene zbog svakodnevnog trošenja ili uslijed patoloških stanja. Danas znamo da mogu biti izolirane iz gotovo svih tkiva ljudskog tijela budući da zapravo nastaju od pericita, stanica koje se nalaze uz endotel krvnih žila. (6) *In vivo*, njihova uloga primarno je usmjerena na lučenje bioaktivnih čimbenika koji posreduju u imunološkom odgovoru, smanjujući upalu i potičući regeneraciju tkiva, što ostavlja mjesto ozljede bez ožiljka. (4) Upravo ova saznanja u potpunosti su promijenila pogled na funkcioniranje i ulogu MSC, što je otvorilo novo poglavlje u istraživanju tih stanica.

### 2.1. Otkriće MSC

Početni koncept mezenhimalnih matičnih stanica postavio je Alexander Jakovlevich Friedenstein 1968. godine. Izolirao je i opisao stanice koštane srži koje morfološki slične fibroblastima, kada se uzgajaju *in vitro*. (7) Pretpostavio je da one prebivaju unutar same koštane srži, uz hematopoetske matične stanice, te posjeduju sposobnost samoobnove i diferencijacije u različita tkiva, pod točno određenim fiziološkim ili eksperimentalnim uvjetima. Zbog toga su inicijalno sva istraživanja bila usmjerena na njihovu ulogu kao multipotentnih matičnih stanica. (3)

Arnold Caplan zapravo je prvi koji je 1988. godine točno opisao proces diferencijacije i dao ime mezenhimalnim matičnim stanicama, što je i objavio 1991. godine. (Slika 1.) Zbog tih razloga smatra se ocem mezenhimalnih matičnih stanica.



**Slika 1:** Multipotentna mezenhimalna matična stanica, izolirana iz koštane srži, pokazuje sposobnost replikacije i diferencijacije u visokospecijalizirana tkiva kao što su kost, hrskavica, mišić, koštana srž, tetiva ili ligament, masno i vezivno tkivo. (4) (Prema viđenju prof. Arnolda Caplana, uz dodatnu vlastitu modifikaciju.)

Prof. Caplan i suradnici izolirali su i ekspandirali u kulturi stanice koštane srži odrasle osobe te zamijetili da dolazi do multipotentne mezenhimalne diferencijacije tih stanica, ali i njihovih klonova. To otkriće ohrabrilu je brojne znanstvenike da istražuju upotrebu MSC kao progenitora, za korištenje u tkivnom inženjerstvu, gdje je bio cilj zamijeniti ili popraviti oštećeno tkivo mezenhimalnog podrijetla. Budući da su se fokusirali na

multipotentnost i tkivno inženjerstvo, zanemarili su istražiti što točno te stanice rade unutar same koštane srži i koja je njihova prirodna, fiziološka uloga, *in vivo*. (8)

Nakon više od 25 godina prof. Caplan objavio je rad u kojem je objasnio tijek i razvoj spoznaja o MSC te novo shvaćanje njihovog djelovanja *in vivo* i *in vitro*.

Ključno pitanje koje se postavljalo bilo je vezano uz njihov stvarni identitet, anatomske lokacije te prirodnu ulogu na tim specifičnim mjestima. Uvidjelo se da je MSC zapravo moguće izolirati iz gotovo svih prokrvljenih tkiva (a ne samo iz koštane srži) jer su one podrijetlom periciti. (4) Protočnom citometrijom dokazali su da MSC i periciti posjeduju identične ispitivane markere na površini stanice. (9)

Novi podaci ukazali su također na dotad nepoznate, dodatne uloge MSC, a upravo im one daju svojstva koja ih definiraju kao medicinske signalne stanice. Dakle, MSC jesu prekursori stanica vezivnog tkiva, ali jednako tako imaju važnu ulogu da na niz načina moduliraju imunološki odgovor i potiču cijeljenje tkiva. (8) Razumijevanje njihovog stvarnog identiteta i funkcija iznimno je važno zbog potpunog iskorištavanja terapijskog potencijala.

## **2.2. Promjena nomenklature**

Razumijevanje njihovog ponašanja *in vivo* daje im posebne karakteristike koje omogućuju da djeluju kao medicinske signalne stanice. Upravo zato postoji polemika oko promjene termina mezenhimalnih matičnih stanica u medicinske signalne stanice. Odnosno, u engleskom jeziku se pod akronimom *MSC* podrazumijevaju oba termina – mezenhimalne matične i medicinske signalne stanice. Radi jednostavnosti, u ovom radu koristimo skraćenicu *MSC* jer se radi o jednoj te istoj vrsti stanica.



Kada se uvidjela potreba za promjenom imena, postojalo je nekoliko mogućih termina, a svi se odnose na istu vrstu stanica:

- mezenhimalne matične stanice,
- medicinske signalne stanice,
- stromalne stanice koštane srži,
- multipotentne stromalne stanice,
- mezodermalne matične stanice,
- mezenhimalne stromalne stanice. (4)

Prof. Caplan i suradnici odlučili su se najprije za *mezenhimalne matične stanice*. Mezenhim se odnosi na zametno vezivno tkivo koje nastaje iz svih triju zametnih listića (dominantno iz mezoderma), a iz kojeg se razvijaju sve vrste potpornog tkiva. (10) Također, MSC su zbog multipotentnosti i klonabilnosti *in vitro* prozване i matičnim stanicama. Prema definiciji, matične stanice bi trebale biti sposobne za serijsku transplantaciju i neograničeno dijeljenje, a postoje radovi o MSC koji potvrđuju ovu definiciju. (11) Ipak, to nije karakteristika njihovog ponašanja *in vivo* što znači da nije najtočnije zvati ih matičnim stanicama.

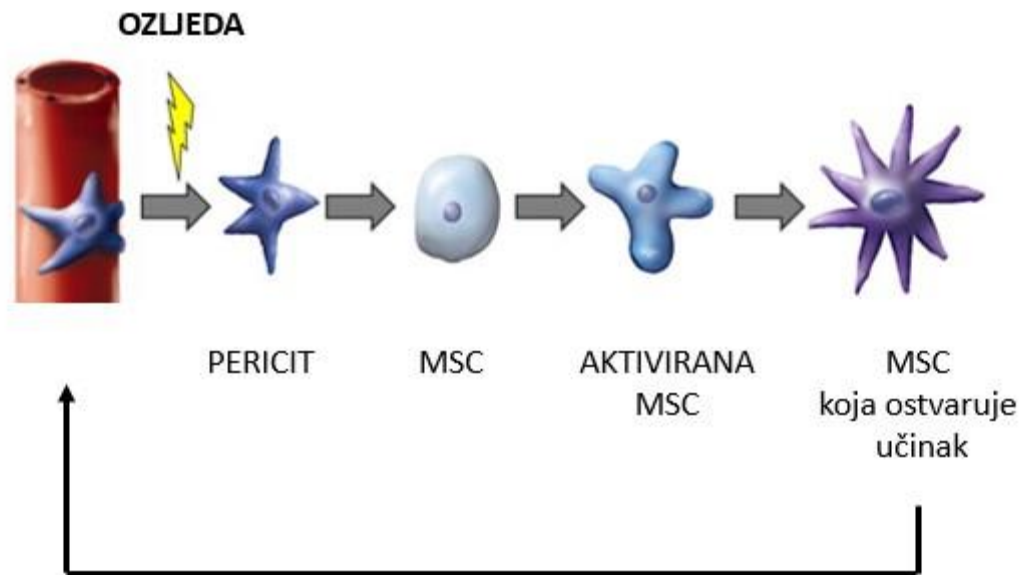
Mezoderm je srednji zametni listić u ranoj embrionalnoj fazi, a formira hrskavično, mišićno, koštano i vezivno tkivo, krv, limfu, bubrege i spolne žlijezde. (10) On najvećim dijelom tvori mezenhim pa je bio razmatran u raspravama oko odabira imena, ali nije prihvaćen. Stroma označava vezivnu potpurnu okosnicu nekog tkiva ili organa, kojom obično prolaze živci, krvne i limfne žile (12), što ne karakterizira MSC. Zbog toga su svi nazivi koji se odnose na stromu odbačeni.

Zbog uloge MSC *in vivo*, što se primarno odnosi na sekretornu funkciju i sposobnost prepoznavanja i djelovanja na mjestu bolesti, ozljede ili upale, željela se naglasiti mogućnost njihove primjene kao (novog) lijeka u medicini. Upravo zato preferira se koristiti termin *medicinske signalne stanice*. (4)

### **2.3. Periciti kao preteče MSC**

Stanice za koje se smatra da imaju najvažniju ulogu u fiziološkom procesu obnove tkiva jesu periciti, perivaskularne mezenhimalne stanice. (13) Oni se otpuštaju s krvnih žila kad im je cjelovitost narušena. Obično su smješteni u *vaskularnim nišama matičnih stanica* koje se najčešće nalaze u adventiciji krvnih žila, gdje se mogu pronaći i endotelne progenitorske stanice, progenitorske stanice glatkih mišića, periadventicijski adipociti i dr. (14) Njihova je uloga raznolika - razvoj, stabilizacija, maturacija i remodelacija krvnih žila, održavanje krvnoga tlaka, proliferacija endotelnih stanica, kontraktilnost vaskularnih glatkih mišića, cijeljenje ozljeda i dr. (15)

Ukoliko postoji lokalizirana upala, ozljeda tkiva ili potreba za regeneracijom, pericit se odvaja od krvne žile, prepoznaje specifično okruženje i pretvara se u MSC. (Slika 2.) Takva aktivirana MSC sposobna je modulirati lokalno imunološko okruženje te uspostavlja zonu regeneracije tkiva. S obzirom na to u kakvoj se mikrookolini nalaze, aktivirane MSC luče različite bioaktivne čimbenike – citokine, kemokine i čimbenike rasta. Najprije, one služe kao prva linija obrane u autoimunoj reakciji protiv raspadnutih produkata ozlijeđenog tkiva, a tek potom utječu na modulaciju imunološkog odgovora te potiču regeneraciju, ukoliko je to potrebno. Nakon što ostvari svoj učinak MSC ponovno postaje pericit. (16)



**Slika 2:** Shematski prikaz aktivacije pericita ozljedom krvne žile.

### 3. DJELOVANJA MSC

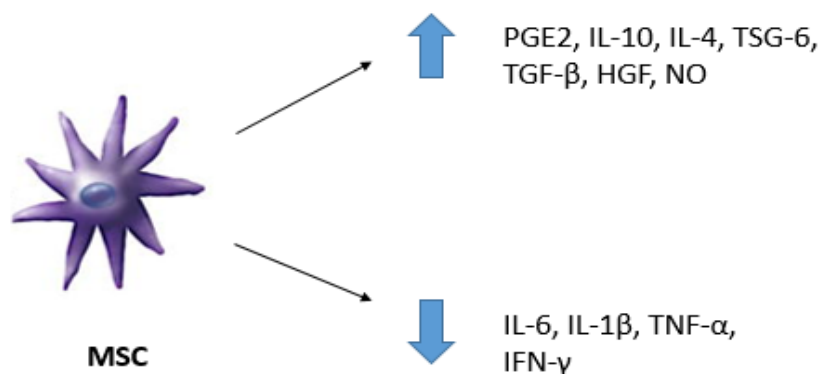
#### 3.1. Imunomodulatorno djelovanje

Imunomodulacija posredovana MSC očituje se kroz zajedničke učinke na staničnoj razini te lučenjem topljivih bioaktivnih čimbenika.

Postoje karakteristike koje ukazuju na imunološku privilegiju, omogućujući tako MSC da izbjegnu imunološko odbacivanje, što je svakako vrijedno jer olakšava kliničku primjenu alogених MSC. Najznačajnije je da MSC na svojoj površini ne izražavaju MHC II molekule ni kostimulirajuće molekule (CD40, CD40 ligand, CD 80 i CD86 (17)), a vrlo slabo MHC I, što omogućuje da ih imunološki sustav domaćina ne prepozna kao strane. (13)

Svoj najveći učinak MSC ostvaruju djelovanjem na monocite/makrofage i regulatorne limfocite T (Treg). (18)

Aktivacija MSC pokreće dva važna parakrina mehanizma negativne povratne sprege. Prvi uključuje prostaglandin E2 (PGE2). PGE2 mijenja aktivnost makrofaga iz proupalnog M1 fenotipa u protuupalni M2 fenotip, a istovremeno stimulira sekreciju velikog broja protuupalnih medijatora kao što su IL-10 i IL-4. (19) Drugi mehanizam odnosi se na *up*-regulaciju protuupalnog proteina TNF- $\alpha$  stimulirani gen/protein 6 (TSG-6). Taj protein ima nekoliko uloga: suprimira aktivaciju proupalnog signalnog puta preko NF- $\kappa$ B, sprječava migraciju neutrofila, smanjuje lučenje proupalnih citokina (IL-6, IL-1 $\beta$  i dr.), kemokina i matriks metaloproteinaza (MMP). Dakle, pojačanom aktivnošću TSG-6, potiče se niz drugih događaja koji svi zajedno smanjuju upalu u ozlijeđenom tkivu. Naravno, učinak MSC ne može biti objašnjen isključivo putem ova dva mehanizma budući da se radi o kompleksnom imunološkom odgovoru, u koji su uključene brojne molekule koje međusobno ulaze u interakciju. Tako u svakom procesu ozlijede ili upale limfociti T luče proupalne citokine kao što su IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , a koji mogu dalje potaknuti lučenje različitih protuupalnih citokina (IL-10, TGF- $\beta$ , HGF, dušičnog oksida (NO) i dr.) (3) Zanimljivo je da ukoliko se MSC primjene intravenski, dokazano se smanjuje lučenje IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , za koje znamo da spadaju u najsnažnije proupalne citokine. (20) Dolazi i do isprepletanja učinaka na molekularnoj i staničnoj razini. Npr. otpuštanje TGF- $\beta$ 1, potaknuto IL-2 i/ili IL-4, dovodi do zaustavljanja proliferacije limfocita T. (21)



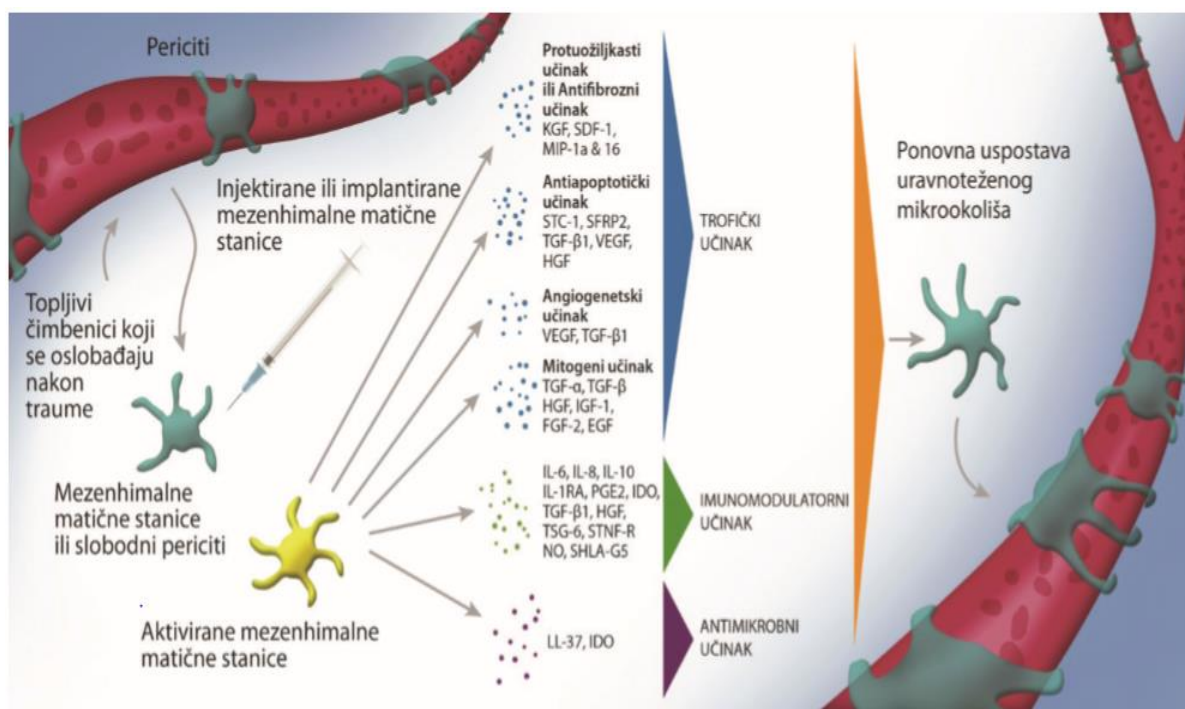
**Slika 3:** Pregled najvažnijih protuupalnih i proupalnih citokina koji sudjeluju u imunomodulaciji.

Također, MSC djeluju i na same stanice imunološkog sustava. One umanjuju odgovor limfocita T na uobičajene stimulatore upale, što dovodi do njihove smanjene aktivacije i proliferacije. Štoviše, MSC mogu inducirati promjenu u „postavkama“ limfocita T koja dovodi do redukcije lučenja proupalnih citokina, a istovremeno pojačane produkcije već spomenutih protuupalnih citokina. (22) Dodatno, potiču proizvodnju Treg, za koje znamo da suprimiraju imunološki odgovor. (19) Djeluju i na limfocite B - pokazalo se da MSC uzrokuju *down*-regulaciju kemokinskih receptora na limfocitima B što sugerira smanjenje migracije limfocita B na mjesto ozljede ili upale. (22) Štoviše, MSC zaustavljaju staničnu proliferaciju limfocita B u G0/G1 fazi što rezultira smanjenim humoralnim odgovorom zbog slabljenja produkcije protutijela. (3) Utječu i na dendritičke stanice koje onda reduciraju sekreciju proupalnih citokina kao što je TNF- $\alpha$ , a pojačano izlučuju IL-10 i druge protuupalne citokine. (23)

Postoji još niz molekula koje se istražuju i povezuju s učincima MSC, što daje prostora za nova saznanja kako bismo točnije razumjeli način funkcioniranja tih stanica.

### **3.2. Regenerativni učinak**

Nakon što se MSC smjeste u ozlijeđeno tkivo, ulaze u interakciju s lokalnim stimulansima, kao što je hipoksija, proupalni citokini, ligandi ili Toll-like receptorom (TLR) što stimulira MSC na proizvodnju značajne količine faktora rasta, koji su glavni odgovorni za regeneraciju tkiva. Uz modulaciju imunološkog odgovora, MSC istovremeno otpuštaju molekule koje podržavaju regeneraciju tkiva na način da: 1. inhibiraju apoptozu, uzrokovanu ishemijom, 2. inhibiraju stvaranje ožiljaka, 3. stimuliraju angiogenezu i potiču stabilnost krvnih žila, 4. imaju mitogeni učinak. Molekule uz pomoć kojih to ostvaruju prikazane su na slici 3.



**Slika 3:** Periciti stimulirani topljivim faktorima rasta i kemokinima postaju aktivirane mezenhimalne matične stanice (MSC) koje, uz interakciju s endotelnim progenitorskim stanicama, na promjenu mikrookoliša reaguju izlučivanjem trofičkih faktora (mitogenih, angiogenetskih, antiapoptotičkih i antifibroznih) te faktora s imunomodulatornim i antimikrobnim učinkom. (24) (Uz dopuštenje prof.dr.sc. Dragana Primorca)

(**KGF** - Keratinocyte growth factor; **SDF-1** - Stromal cell-derived factor 1; **MIP-1a&16** - Macrophage inflammatory protein 1alpha & 16; **STC-1** - Secretine tumor cell line 1; **SFRP2** - Secreted frizzled-related protein 2; **TGF-β1** - Transforming growth factor β1; **VEGF** - Vascular endothelial growth factor; **HGF** - Hepatocyte growth factor; **TGF-α** - Transforming growth factor α; **IGF-1** - Insulin-like growth factor 1; **FGF-2** - Fibroblast growth factor 2; **EGF** - Epidermal growth factor; **IL-6** - interleukin 6; **IL-8** - interleukin 8; **IL-10** - interleukin 10; **IL-1RA** - interleukin-1 receptor antagonist; **PGE2** - Prostaglandin E2; **IDO** - Indoleamine 2,3-dioxygenase; **TSG-6** - TNF-α stimulated gene/protein 6; **sTNF-R** - Soluble Tumor necrosis factor receptor; **NO** - Nitric oxide; **sHLA-G5** - Soluble Human leukocyte antigen G5)

Ono što je dodatno primijećeno jest specifični antimikrobni učinak koji MSC posjeduju. MSC potiču lučenje proteina LL-37, koji ima snažno antimikrobno djelovanje. Uz imunosupresivni, protuupalni učinak, to im svojstvo omogućuje primjenu u specifičnim stanjima kao što je sepsa.

#### 4. TERAPIJSKA PRIMJENA MSC

Ukoliko se unesu egzogeno, specifične su po tome što točno prepoznaju mjesto ozljede, bolesti ili upale, gdje se usmjeruju. (6) Upravo to svojstvo daje im velike mogućnosti za terapijsku primjenu.

Generalno, postoje dva osnovna pristupa u egzogenoj primjeni MSC – lokalna i sistemska primjena. Lokalna primjena uključuje intraperitonealnu, intramuskularnu ili intrakardijalnu injekciju dok se sistemski MSC mogu davati intravenski ili intraarterijski. Obično se apliciraju intravenski (a uobičajena je primjena kroz perifenu venu), i tada se koristi njihova sposobnost da migriraju na specifično mjesto upale.

Udomljenje MSC u oštećenom tkivu povezano je s aktivnošću nekoliko molekula: kemokina, adhezijskih molekula i enzima matriks metaloproteinaza. Na životinjskim modelima dokazano je da MSC luče kemokin CXCL12, koji se u ciljnom tkivu veže za receptor CXCR4, te CCL2, koji se veže na receptor CCR2. Ipak, glavni medijatori u procesu usmjeravanja su adhezijske molekule, P-selektini te VCAM-1-VLA-4 interakcija. Ono što je zanimljivo u eksperimentalnim modelima jest to da one MSC koje su obložene većim brojem VCAM-1 antigena pokazuju bolju efikasnost. To sugerira da udomljenje MSC u većoj koncentraciji ima bolji učinak na oštećeno tkivo, što je važno iskoristiti u pripremi za terapijsku primjenu. Uz to, pojedini tipovi matriks metaloproteinaza (MMP-2 i MT-MMP) također pokazuju značajnu ulogu u invazivnosti MSC na putu prema ciljnom tkivu. Važno je naglasiti da pojedini proupalni citokini, poput TNF $\alpha$  i IL-1, potiču ekspresiju svih navedenih molekula (*up*-regulacija).

Intraarterijska primjena koristi se kada se želi poboljšati akumulacija i povisiti koncentracija MSC u području koje tretiramo. (6)



Optimalan način primjene temelji se na dominantnom učinku i određenom konkretnom mehanizmu djelovanja MSC koji se želi postići. Osim načina primjene, na učinak koji želimo postići pri konkretnom patološkom stanju utječe i vrijeme same aplikacije MSC, što se razlikuje od bolesti do bolesti.

## **5. REMESTEMCEL-L**

MSC su danas zbog svojih karakteristika predmet interesa brojnih kliničara. Osnovna ideja jest aplicirati matične stanice u područje zahvaćeno patološkim procesom s ciljem da one budu medijator reparacijskom i regenerativnom odgovoru oštećenog organa. Remestemcel-L je trenutno dostupna stanična terapija koja sadržava u kulturi ekspanzirane, krioprezervirane mezenhimalne matične stanice. MSC su dobivene iz koštane srži zdravih donora. Lijek je odobren za kliničku primjenu od strane Food and Drug Administration (FDA). (19) Primjenjuje se intravenski, a doza ovisi o indikaciji.

Remestemcel-L čine stanice koje su slabo imunogenične zahvaljujući nedostatku ekspresije MHC II molekula. Upravo zato izazivaju slabi, ili čak nikakav, imunološki odgovor, nakon intravenskog davanja, što je svakako njihova velika prednost. (20)

Danas je Remestemcel-L dostupan u nekim zemljama svijeta gdje se već primjenjuje za liječenje akutnog GVHD-a u pedijatrijske populacije, i za refraktorni GVHD. (26)

## **6. TERAPIJSKE INDIKACIJE**

Ono što je danas predmet brojnih istraživanja jest upravo primjena MSC u konkretnim patološkim stanjima. Prema podacima američkog *Nacional Institutes of Health* (<http://www.clinicaltrial.gov/>), na dan 23. siječnja 2020., postoji čak 1035 kliničkih istraživanja (u svim fazama kliničkih istraživanja) koja proučavaju terapijski učinak MSC. MSC pokazuju potencijal za liječenje ogromnog broja imunoloških i neimunoloških poremećaja.

Navest ćemo raspon terapijskih indikacija gdje je primjena MSC pronašla svoje mjesto, jer najbolje oslikava važnost i vrijednost istraživanja MSC kako bi se unaprijedile postojeće mogućnosti liječenja.

Mogućnost primjene značajna je pri hematološkim bolestima. Znamo da je alogena transplantacija matičnih stanica postupak koji se učinkovito primjenjuje u nekim hematološkim patološkim stanjima (npr. u liječenju nekih oblika leukemije, multiplog mijeloma, limfoma i dr.) Glavni problemi koji limitiraju efikasnost same transplantacije su infekcije, krvarenja, neuspjela transplantacija te *graft-versus-host-disease* (GVHD). GVHD zapravo je način odbacivanja gdje transplantirane stanice napadaju stanice tkiva i organa domaćina (najčešće probavni sustav, kožu, jetru i pluća), a povezan je s visokim mortalitetom. Akutni GVHD javlja se u 30-80% transplantiranih i inicijalno se liječi kortikosteroidima. (27) MSC se u kliničkim istraživanjima primjenjuju ukoliko GVHD ne reagira na kortikosteroide ili se bolest ponovno javi, i pokazuju izvrsne rezultate (značajno kliničko smanjenje bolesti, bez komplikacija). (28) Jednako tako, postoji slučaj pacijentice oboljele od akutne mijeloične leukemije gdje su MSC primijenjene odmah, nakon same transplantacije matičnih stanica, sa svrhom imunosupresije. Kao rezultat, stanice transplantata su prihvaćene i nije se pojavio ni akutni ni kronični oblik GVHD-a. Nakon 31 mjeseca došlo je do potpune remisije leukemije u te pacijentice. (29) Također, MSC su pokazale uspjeh i u liječenju refraktorne aplastične anemije. (30)

Primjena MSC proučava se i u kardiovaskularnim bolestima gdje pokazuje zaista obećavajuće rezultate. Unatoč razvoju terapijskih opcija, ishemijska srčana bolest i zatajivanje srca i dalje su vodeći uzroci smrti u svijetu, pa se moraju tražiti dodatna rješenja. (31) Zbog svojih karakteristika, MSC se mogu primijeniti nakon infarkta miokarda, s ciljem oporavka i regeneracije samog srčanog mišića, odnosno

izbjegavanjem stvaranja ožiljka. I zaista, rađeno je istraživanje gdje su nakon perkutane koronarne intervencije pacijentima injicirali MSC. Nakon samo 3 mjeseca u ljudi koji su primali MSC nađeno je značajno smanjenje hipokinetičkog, akinetičkog i diskinetičkog segmenta na miokardu, bolja kontraktilnost ventrikula te poboljšana ejekcijska frakcija. (32)

Postoje pretklinička istraživanja koja su pokazala sigurnost i efikasnost kod primjene MSC u liječenju bolesti dišnog sustava – astme, alergijskog rinitisa, bronhopulmonalne displazije, kronične opstruktivne plućne bolesti. (33)

Što se tiče neuroloških bolesti, kao heterogene skupine bolesti, MSC su našle svoju učinkovitu upotrebu. Prema pretkliničkim istraživanjima, čini se da MSC efektivno smanjuju upalu živčanog sustava, smanjuju veličinu lokalnih lezija te reduciraju simptome neuroloških funkcionalnih deficita. (34,35) Najveći broj istraživanja usmjeren je prema multiploj sklerozi (MS), amiotrofnoj lateralnoj sklerozi (ALS) te ozljedi kralježnične moždine, iako postoji i nekoliko studija koje proučavaju učinak MSC u Parkinsonovoj bolesti te Alzheimerovoj demenciji. (27) Primjena MSC izgleda obećavajuće kao terapija raznih neurodegenerativnih bolesti, što je danas interes brojnih kliničara. (36)

Nakon prve izolacije, MSC su čvrsto bile vezane uz fiziologiju kosti i hrskavice kada su imale središnju ulogu u rastu i obnovi, što se objašnjavalo njihovim prirođenim regenerativnim kapacitetom. Štoviše, njihova intrinzična mogućnost da se diferenciraju u osteocite i hondrocite činila ih je prikladnim kandidatima za liječenje bolesti koštano – zglobnog sustava. Stoga je danas najveći broj istraživanja usmjeren upravo prema spomenutim bolestima. (27) Osteoartritis je vrsta artritisa kojeg karakterizira degeneracija zglobne hrskavice praćena sklerozacijom subhondralne kosti te upalom

sinovije. (37) Bolest je jedna od najčešćih kroničnih bolesti u populaciji starijih od 65 godina. Unatoč visokoj prevalenciji, još uvijek nije nađena odgovarajuća terapija koja bi uspjela preokrenuti tijek bolesti. Zato je važno naglasiti da MSC pokazuju ohrabrujuće izgleda za poboljšanje stanja uslijed bolesti. Znatne pretkliničke i kliničke studije pokazuju potencijal MSC da stimuliraju regeneraciju hrskavice te zaustave progresivnu destrukciju zglobova. (38) Dodatno, obećavajući rezultati postoje i u liječenju *osteogenesis imperfecta*. (39)

Zahvaljujući navedenim sposobnostima imunomodulacije, diferencijacije i otpuštanja raznovrsnih bioaktivnih molekula, pretpostavlja se da MSC mogu biti djelotvorne u bolestima organa koje nastaju kao posljedica ozljede tkiva i/ili degeneracije. Zaista, postoje studije u kojima se dokazala efikasnost MSC u popravljaju oštećenog tkiva i/ili poboljšanja funkcije nakon ozljede pluća (40), jetre (41) i bubrega (42).

Primjena i učinak MSC također se proučava u liječenju autoimunih bolesti, kao što je npr. sistemski eritematozni lupus (SLE). SLE je autoimuna bolest različitih kliničkih prezentacija, koja može zahvatiti bilo koji organ u tijelu. Iako se uglavnom uspješno liječi standardnom imunosupresivnom terapijom, zbog značajnih nuspojava koje ona donosi i zbog slučajeva koji su rezistentni na uobičajenu terapiju, posegnulo se za eksperimentalnom primjenom MSC. Studije su pokazale indukciju kliničke remisije te poboljšanje seroloških pokazatelja disfunkcije organa. (43) Uz autoimune bolesti, MSC se istražuju i kod Crohnove bolesti – kronične upalne bolesti crijeva, gdje pokazuju ohrabrujuće rezultate. (44,45)

Transplantacija organa je još jedna od indikacija gdje MSC pokazuju terapijski potencijal. Najvećim dijelom usmjerena su prema transplantaciji jetre i bubrega. Bez obzira na ohrabrujuće rezultate pretkliničkih studija, potrebno je najprije riješiti

određena pitanja prije nego što terapija temeljena na MSC postane sigurna opcija za klinička ispitivanja. (27)

## 7. PRIKAZ BOLESNICE

Prikazat ćemo slučaj u kojem bi potencijalna primjena MSC pronašla svoje mjesto.

N. V. rođena je 13.01.2015. Ona je djevojčica koja boluje od mukopolisaharidoze tip 1-H (Hurlerin sindrom).

Mukopolisaharidoze (MPS) su progresivne nasljedne bolesti uzrokovane nedostatkom enzima koji sudjeluju u razgradnji mukopolisaharida, tj. glikozaminoglikana (GAG). Zbog nedostatka enzima, nerazgrađeni ili djelomično razgrađeni GAG-i nakupljaju se u lizosomima različitih tkiva. Stanice u kojima se nakupljaju nerazgrađeni produkti prestaju normalno funkcionirati, pa dolazi do oštećenja mnogih organa i organskih sustava. Očituju se širokom paletom kliničkih simptoma koji uključuju hepatosplenomegaliju, dysostosis multiplex, grube crte lica, oštećenje sluha i vida, opstrukciju gornjih dišnih putova, restriktivnu plućnu bolest, oštećenje srčanih zalistaka, artropatiju, neurološka oštećenja i mentalno zaostajanje. Životna dob javljanja prvih simptoma, brzina progresije, klinička slika i očekivano trajanje života različito je ovisno o tipu bolesti. Opisano je nekoliko enzima čiji nedostatak dovodi do sedam različitih tipova mukopolisaharidoze. (46)

Naša pacijentica boluje najtežeg oblika bolesti – mukopolisaharidoze tip 1-H u kojem nedostaje enzim  $\alpha$ -iduronidaza.

Dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike i biokemijskih nalaza - pojačanog izlučivanja GAG-a u urinu te nedostatka aktivnosti enzima u leukocitima ili kulturi fibroblasta, a može se raditi i analiza pojedinog gena. (46)

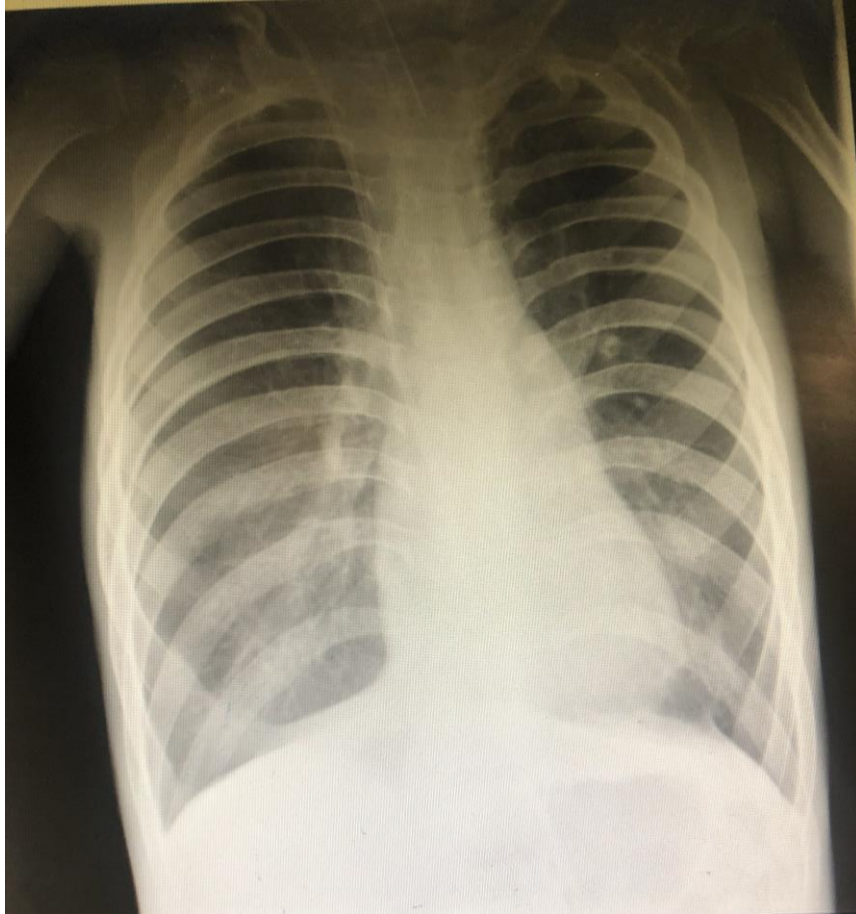
**Tablica 1:** Podjela i glavna obilježja svih tipova mukopolisaharidoza. (46)

<b>Kratica</b>	<b>Eponim/naziv</b>	<b>Enzim</b>	<b>Klinička slika</b>
<b>MPS I-H</b>	Hurler	$\alpha$ -iduronidaza	Mentalno zaostajanje, grube crte lica, makrokranija, zamućenje rožnice, deformacije kostura, hepatosplenomegalija, promjene na srč. zaliscima;
<b>MPS I-S</b>	Scheie	$\alpha$ -iduronidaza	Ukočenje zglobova, zamućenje rožnica, uredan mentalni status;
<b>MPS I-H/S</b>	Hurler-Scheie	$\alpha$ -iduronidaza	Prijelazni oblik između MPS I-H i MPS I-S;
<b>MPS II</b>	Hunter	Iduronat-2-sulfataza	Slična kao MPS I-H, ali bez zamućenja rožnice, naglušost;
<b>MPS III-A</b>	Sanfilippo A	Sulfamidaza	Blagi somatski, a teški neurološki simptomi nakon 3. godine (agresivno ponašanje, propadanje motorike i govora, spastična tetrapareza, rijetko konvulzije); kl. slika slična u svih oblika MPS III;
<b>MPS III-B</b>	Sanfilippo B	$\alpha$ -N-acetilglukozamidaza	
<b>MPS III-C</b>	Sanfilippo C	AcCoA: $\alpha$ -glukozaminid-N-Ac-transferaza	
<b>MPS III-D</b>	Sanfilippo D	Glukozamin-6-sulfataza	
<b>MPS IV-A</b>	Morquio A	Galaktozamin-6-sulfataza	Patuljast rast, zamućenje rožnice, teška kifoskolioza i kontrakture zglobova, insuficijencija aorte;
<b>MPS IV-B</b>	Morquio B	$\beta$ -galaktozidaza	Kao MPS IV-A, ali blaža kl. slika;
<b>MPS VI</b>	Maroteaux-Lamy	N-acetil-galaktozamin-4-sulfataza	Teške koštane promjene, zamućenje rožnice, uredna inteligencija;
<b>MPS VII</b>	Sly	$\beta$ -glukuronidaza	Većinom kao MPS I-H, ali velika varijabilnost u kl. slici;

Liječenje bolesti raznovrsno i multidisciplinarno. Velik dio liječenja odnosi se na suportivnu i simptomatsku terapiju, što uvelike olakšava tegobe i poboljšava kvalitetu života u ovih pacijenata. Osnova liječenja je enzimsko nadomjesno liječenje, ali može se provoditi samo za tipove 1, 2, 4 i 6. Postoji i mogućnost rane transplantacije krvotvornih matičnih stanica, što dokazano modificira prirodni tijek bolesti, iako ne dovodi do izlječenja. Preporuča se transplantaciju učiniti što prije, a najkasnije do kraja druge godine života. (46)

Pet mjeseci po rođenju djevojčice, 23.06.2015., u Utrechtu je i učinjena transplantacija koštane srži.

Nažalost, djevojčica se i danas bori s posljedicama transplantacije – kroničnim GVHD-om (cGVHD) na plućima koji se očituje kao bronhiolitis obliterans sindrom (BOS), a prati ga zaglavljivanje zraka, ovisnost o kisiku, česte akutne superinfekcije što sve dovodi do kroničnog respiratornog zatajenja praćenog tahidispnejom i *wheezingom*. (Slika 4.) Uslijed učestalih infekcija dišnih puteva, pacijentica je razvila i bronhiektazije. (Slika 5.) Djevojčica je konstantno tahidispnoična, koristi pomoćnu dišnu muskulaturu pri disanju, zadovoljavajuću saturaciju postiže uz primjenu kisika (0,1 – 0,5 L/min).



**Slika 4:** RTG snimka srca i pluća; AP projekcija. Vidljiv veliki bačvasti prsni koš uz izraženu hiperinflaciju. (Uz dopuštenje doc.dr.sc. Marija Čuka, Klinika za pedijatriju, KBC Zagreb.)

Bronhiolitis obliterans (BO) je kronična ireverzibilna opstruktivna bolest pluća koja zahvaća male dišne puteve. Razlikujemo tri osnovna entiteta: postinfektivni BO (PIBO); BO nakon transplantacije pluća; te BO nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica (HSCT). Kada govorimo o BOS podrazumijevamo klinički sindrom koji nastaje kao posljedica transplantacije pluća ili HSCT, a za potvrdu nije potreban histopatološki nalaz već je dovoljan nalaz CT-a visoke rezolucije. (47)

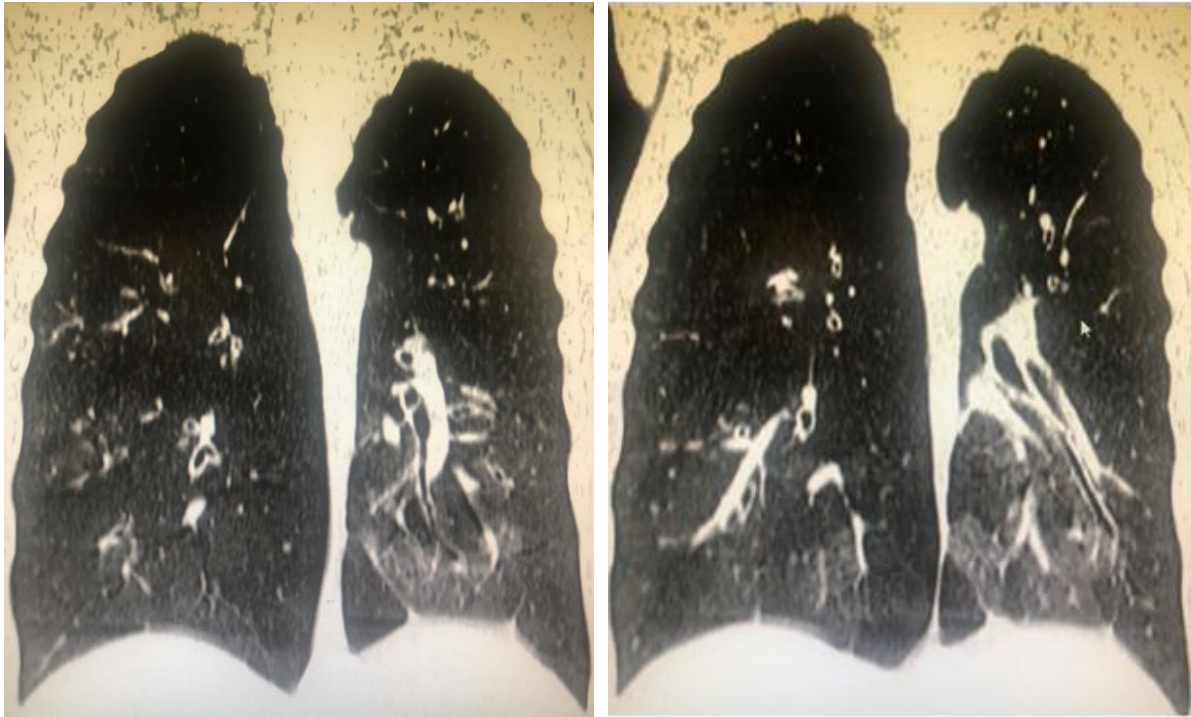
Literatura navodi da oko 5% do 14% svih pacijenata nakon HSCT razvije plućni oblik cGVHD-a koji se klinički prezentira kao BOS. (49) Karakterizira ga fibrinozna obliteracija respiratornih bronhiola. U početku bolesti može biti prisutna i intersticijska



pneumonija, a infiltrati upalnih stanica uglavnom se sastoje od neutrofila i mononuklearnih stanica. Postoje različiti stupnjevi intraluminalne ili peribronhiolarne fibroze, u rasponu od proliferacije fibroblasta i miofibroblasta sve do ožiljaka kolagena. To dovodi do progresivne cirkumferentne fibroze i konačnog stvaranja ožiljnog tkiva na malim terminalnim dišnih putevima, što se klinički očituje kao opstrukcija protoka zraka. Imunološka podloga posttransplantacijskog kroničnog oblika GVHD-a na plućima nije u potpunosti razjašnjena. (49)

Dijagnoza bolesti je klinička. Potrebno je zadovoljiti sve sljedeće kriterije:

1. Omjer  $FEV_1/VC < 0.7$  ili  $< 5.$  percentile od predviđenog ( $FEV_1$ =forsirani ekspiratorni volumen u 1. sekundi;  $VC$ =vitalni kapacitet; za pedijatrijsku populaciju granične vrijednosti predviđene za dob mogu se izračunati NHANESIII kalkulatorom);
2.  $FEV_1 < 75\%$  od predviđenog uz  $> 10\%$  pad u manje od 2 godine;
3. Odsutnost infekcije respiratornog trakta;
4. Jedna od dvije značajke BOS-a: CT – zaglavljivanje zraka ili zadebljanje malih dišnih puteva ili bronhiektazije; ili  $RV > 120\%$  ( $RV$ =rezidualni volumen). (51)



**Slika 5:** CT snimka prsnog koša. Vidljive su izražene bronhiektazije. (Uz dopuštenje doc.dr.sc. Marija Ćuka, Klinika za pedijatriju, KBC Zagreb.)

Terapija BOS-a uključuje povećanje doza imunosupresivnih lijekova (prednizolon, takrolimus, sirolimus, ciklosporin, azatioprin, mikofenolat mofetil i dr.) budući da se očituje kao oblik kroničnog odbacivanja. Trojna terapija koja uključuje inhalacijski kortikosteroid (flutikazon), oralni montelukast i azitromicin, dokazano smanjuje pogoršanje plućne funkcije. Ekstrakorporalna fotofereza također je dostupni oblik terapije koji bi trebao usporiti pogoršanje plućne funkcije. Kada je BOS progresivan i ne odgovara na liječenje, kao zadnje rješenje nudi se transplantacija pluća. (52)

U naše pacijentice provode se sve navedene medikamentozne terapijske mogućnosti. (Slika 6.) Redovito se provodi i ekstrakorporalna fotofereza.

### Terapija

(Ima-Sir + FAM + N-acetil)

Imatinib 2x12.6 mg na PEG (08,20h);

Sirolimus/Rapamunes 1x1.1 mg na PEG (16h);

Flixotide 2x1potisak od 250 mcg na babyhaler (7,19h);

Azitromicin 1x120 mg na PEG (PON, SRI, PET);

Melarth 1x4 mg na PEG (18h);

Fluimukan/N-acetilcistein 2x250 mg na PEG (7, 19).

Ventolin 2x1upuh na baby haler (7, 19h); trenutno i prema potrebi i 2x2 upuha iil 3x2 upuha ovisno o trenutnim tegobama i nakon konzultacija telefonom

Teofilin 4x120 mg na PEG (6,12,18,24h);

Sinersul 2x240 mg na PEG (10,22h);

Diflucan (10mg/ml) 1x70 mg (7 ml) na PEG (8)

Clexane 2x12 mg (1200 IU) s.c. (7,19h);

Zipantola 1x10 mg na PEG (7h);

Sildenafil 3x5 mg na PEG (6,14,22h);

Vit. D3 1x 5 kapi na PEG (12h);

Aktiferin kapi 2 x 3 ml na PEG (09, 21h)

Inhalacije fiziološkom otopinom više puta dnevno.

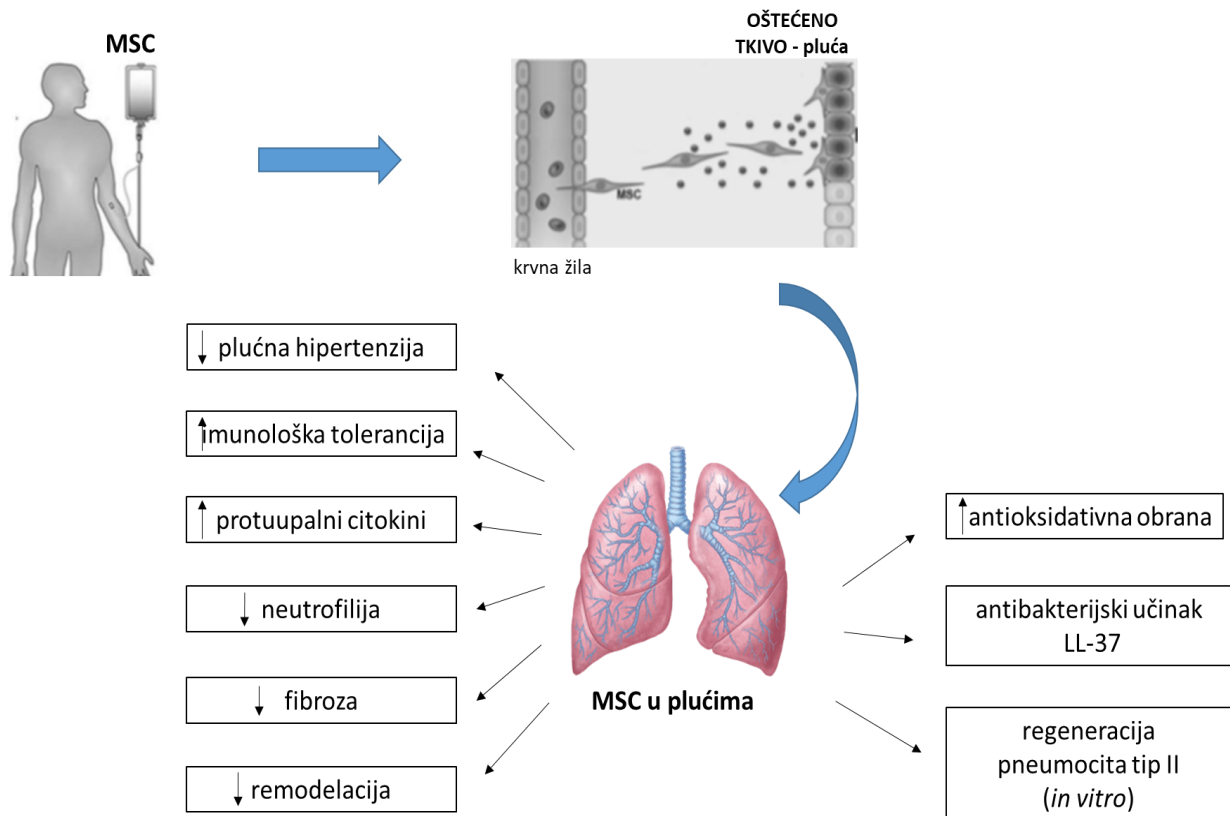
Esprico omega 3-6-9 (EPA/DHA, GLA, Mg/Zn) 1x1 vrećica, Neurobion 1x1/2 tbl. Multivitamin. Respiratorna, fizikalna i razvojna terapija te položajna drenaža u mjeri u kojoj je moguće za što bolju evakuaciju sekreta iz pluća.

Oksigenoterapija kisikom na nosne nastavke od 0,1-0,5 l/min odnosno koliko je potrebno za održavanje SaO<sub>2</sub> oko 95 %.

**Slika 6:** Prikaz terapije pacijentice N.V. na posljednjoj kontroli. (Uz dopuštenje doc.dr.sc. Marija Čuka, Klinika za pedijatriju, KBC Zagreb.)

Budući da njeno stanje na plućima progredira, a trenutna terapija postaje nedostatna, potrebno je posegnuti za novim metodama liječenja. MSC mogu osigurati lokalni izvor trofičkih čimbenika u plućnom okruženju, što rezultira promjenama pri bilo kakvoj upali u plućima. (53)

Nema dostupnih podataka o učinku MSC na cGVHD, ali budući da trenutno drugog rješenja nema, predlaže se da djevojčica dobije priliku za liječenje Remestemcel-L-om. Upravo ova terapija potencijalno bi mogla produljiti vrijeme do željene i očekivane transplantacije pluća, kada bi ona bila u povoljnijoj prognostičkoj skupini za transplantaciju.



**Slika 7:** Predmnijevani mehanizam djelovanja MSC, kojeg očekujemo u naše pacijentice. Intravenska infuzija MSC; bivaju zarobljene u vaskularnoj kapilarnoj mreži pluća što pogoduje da tamo ostvare učinak. (54)

Postoje još brojna pitanja koja treba riješiti prije nego što se djevojčici omogući terapija MSC. Za početak, pitanje je u kojoj dozi primijeniti lijek budući da u literaturi nema dostupnih podataka o primjeni MSC u ovoj indikaciji. Također, problem je dužine trajanja učinka kod kroničnih stanja, što povlači za sobom pitanje o učestalosti primjene. Naravno, postoji problem i financijske isplativosti, budući da je vjerojatnost učestalog davanja velika, a lijek je skup i u Europi nije registriran za kliničku primjenu. Na kraju, ali ne i manje važno, bitno je riješiti određene etičke dileme budući da lijek još nikada nije primijenjen u ovoj indikaciji. Bez obzira na sve navedeno, bitno je ustrajati u mogućoj primjeni MSC jer je to trenutno jedino rješenje, koje bi potencijalno

moglo olakšati život našoj pacijentici i njezinoj obitelji, a to je ono zbog čega medicina postoji.

## **8. ZAKLJUČAK**

Sve veći broj istraživanja sugerira iznimnu važnost i značaj potencijalne primjene MSC u kliničkoj praksi. Nova saznanja o stanicama i načinu na koji one djeluju u organizmu otvorila su prostor za razvoj terapije koja je primjenjiva u nizu bolesti, a koje trenutno nemaju učinkovito liječenje. Imunomodulatorni učinak koji te stanice posjeduju jest kompleksan i zahtijeva daljnje istraživanje kako bismo bolje razumjeli mehanizme djelovanja, a što je bitno iskoristiti u ciljanoj primjeni za određene bolesti. Budući da MSC stimuliraju angiogenezu, imaju mitogeni učinak, inhibiraju apoptozu i stvaranje ožiljka, imaju vrijednu ulogu u regeneraciji tkiva. Zajednički učinak imunomodulacije i regeneracije dodatna je prednost MSC. Remestemcel-L jest jedina trenutno dostupna terapija koja se koristi kao lijek, ali samo u rijetkim indikacijama. Zbog cijene, dugotrajnosti i kompleksnosti postupka registracije lijeka te nedovoljno istraženih učinaka na ljudima, MSC još uvijek zahtijevaju dodatna ispitivanja kako bi u svijetu bile korištene u svakodnevnoj primjeni. Budući napori moraju biti usmjereni upravo prema tome jer pretklinička saznanja obećaju mnogo.

## 9. ZAHVALE

Zahvaljujem svojem mentoru, doc.dr.sc. Mariju Ćuku, na pristupačnosti, razumijevanju i pomoći oko izrade ovog rada. Vaš entuzijazam, znanje i vedrina poticao su i uzor.

Hvala svim prijateljima uz koje je studentsko razdoblje bilo puno ljepše. Zajedno smo prošli kroz sve poteškoće, bodrili se i učili jedni od drugih, kako o medicini tako i o životu.

Hvala Marinu. Ti si moja podrška i motivacija. Uz tvoju ljubav sve je moguće.

Velika zahvala mojoj obitelji, mojim roditeljima i sestrama. Hvala za bezgraničnu požrtvornost i ljubav, hvala što podržavate svaki moj korak i uvijek ste uz mene.

I na kraju hvala dragom Bogu koji sve od početka vodi.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Andreis I, Taradi M, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, et al. *Imunologija*. Sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
2. Zhao RC, Liao L, Han Q. Mechanisms of and perspectives on the mesenchymal stem cell in immunotherapy. *J Lab Clin Med*. 2004 May;143(5):284–91.
3. Ho MSH, Mei SHJ, Stewart DJ. The Immunomodulatory and Therapeutic Effects of Mesenchymal Stromal Cells for Acute Lung Injury and Sepsis: IMMUNOMODULATORY THERAPEUTIC EFFECTS OF MSCs. *J Cell Physiol*. 2015 Nov;230(11):2606–17.
4. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *STEM CELLS Transl Med*. 2017;6(6):1445–51.
5. Lee OK, Kuo TK, Chen W-M, Lee K-D, Hsieh S-L, Chen T-H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1669–75.
6. Wei X, Yang X, Han Z, Qu F, Shao L, Shi Y. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*. 2013 Jun;34(6):747–54.
7. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. HETEROTOPIC TRANSPLANTS OF BONE MARROW: Transplantation. 1968 Mar;6(2):230–47.
8. Caplan AI, Correa D. The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011 Jul;9(1):11–5.
9. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep;3(3):301–13.
10. Junqueira LCU, Carneiro J, Banek L, Bradamante Ž, Kostović-Knežević L. *Osnove histologije: udžbenik i atlas prema desetome američkom izdanju*. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
11. Dennis JE, Carbillet J-P, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ Marrow Cell Population Is Multipotential. *Cells Tissues Organs*. 2002;170(2–3):73–82.
12. Padovan I, editor. *Enciklopedijski rječnik humanog i veterinarskog medicinskog nazivlja*. Zagreb: Hrvatska Akademija Znanosti i Umjetnosti; 2006. 1884 p.
13. Kean TJ, Lin P, Caplan AI, Dennis JE. MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. *Stem Cells Int*. 2013;2013:1–13.
14. Bobryshev YV, Orekhov AN, Chistiakov DA. Vascular stem/progenitor cells: current status of the problem. *Cell Tissue Res*. 2015 Oct;362(1):1–7.

15. Gökçinar-Yagci B, Uçkan-Çetinkaya D, Çelebi-Saltik B. Pericytes: Properties, Functions and Applications in Tissue Engineering. *Stem Cell Rev Rep*. 2015 Aug;11(4):549–59.
16. Caplan AI. New MSC: MSCs as pericytes are Sentinels and gatekeepers: MSCs, PERICYTES, METASTASIS, REGENERATIVE MEDICINE. *J Orthop Res*. 2017 Jun;35(6):1151–9.
17. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815–22.
18. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front Immunol*. 2019 Jun 4;10:1191.
19. Zheng G, Huang R, Qiu G, Ge M, Wang J, Shu Q, et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles: regenerative and immunomodulatory effects and potential applications in sepsis. *Cell Tissue Res*. 2018 Oct;374(1):1–15.
20. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815–22.
21. Ruegemer JJ, Ho SN, Augustine JA, Schlager JW, Bell MP, McKean DJ, et al. Regulatory effects of transforming growth factor-beta on IL-2- and IL-4-dependent T cell-cycle progression. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1990 Mar 1;144(5):1767–76.
22. Patel SA, Sherman L, Munoz J, Rameshwar P. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008 Feb;56(1):1–8.
23. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):2214–9.
24. Sertić J, Gamulin S, Sedlić F. MOLEKULARNA GENETIKA-novosti u dijagnostici i terapiji. *Medicinska naklada*; 2018.
25. Daly A. Remestemcel-L, the first cellular therapy product for the treatment of graft-versus-host disease. *Drugs Today*. 2012;48(12):773.
26. Remestemcel-L [Internet]. [cited 2020 Feb 8]. Available from: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB13973>
27. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant*. 2016 May;25(5):829–48.
28. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet*. 2004 May;363(9419):1439–41.



29. Lee ST, Jang JH, Cheong J-W, Kim JS, Maemg H-Y, Hahn JS, et al. Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br J Haematol*. 2002 Sep;118(4):1128–31.
30. Xiao Y, Jiang Z-J, Pang Y, Li L, Gao Y, Xiao H-W, et al. Efficacy and safety of mesenchymal stromal cell treatment from related donors for patients with refractory aplastic anemia. *Cytotherapy*. 2013 Jul;15(7):760–6.
31. Wang J, Liao L, Tan J. Mesenchymal-stem-cell-based experimental and clinical trials: current status and open questions. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Jul;11(7):893–909.
32. Chen S, Fang W, Qian J, Ye F, Liu Y, Shan S, et al. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)*. 2004 Oct;117(10):1443–8.
33. Weiss DJ, Bates JHT, Gilbert T, Liles WC, Lutzko C, Rajagopal J, et al. Stem Cells and Cell Therapies in Lung Biology and Diseases: Conference Report. *Ann Am Thorac Soc*. 2013 Oct;10(5):S25–44.
34. Drela K, Siedlecka P, Sarnowska A, Domanska-Janik K. Human mesenchymal stem cells in the treatment of neurological diseases. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)*. 2013;73(1):38–56.
35. Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011 Mar;24(1):59–64.
36. Volkman R, Offen D. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells in Neurodegenerative Diseases: Mesenchymal Stem Cells in Neurodegenerative Diseases. *STEM CELLS*. 2017 Aug;35(8):1867–80.
37. Gharbi M, Deberg M, Henrotin Y. Application for Proteomic Techniques in Studying Osteoarthritis: A Review. *Front Physiol* [Internet]. 2011 [cited 2020 Jan 28];2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2011.00090/abstract>
38. Liu Y, Wu J, Zhu Y, Han J. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in bone and joint diseases. *Clin Exp Med*. 2014 Feb;14(1):13–24.
39. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. 1999 Mar;5(3):309–13.
40. Curley GF, Hayes M, Ansari B, Shaw G, Ryan A, Barry F, et al. Mesenchymal stem cells enhance recovery and repair following ventilator-induced lung injury in the rat. *Thorax*. 2012 Jun;67(6):496–501.

41. Kanazawa H, Fujimoto Y, Teratani T, Iwasaki J, Kasahara N, Negishi K, et al. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hepatic Ischemia Reperfusion Injury in a Rat Model. Gaetano C, editor. PLoS ONE. 2011 Apr 29;6(4):e19195.
42. Alfarano C, Roubex C, Chaaya R, Ceccaldi C, Calise D, Mias C, et al. Intraparenchymal Injection of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Reduces Kidney Fibrosis after Ischemia-Reperfusion in Cyclosporine-Immunosuppressed Rats. *Cell Transplant*. 2012 Sep;21(9):2009–19.
43. Wang D, Zhang H, Liang J, Li X, Feng X, Wang H, et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Severe and Refractory Systemic Lupus Erythematosus: 4 Years of Experience. *Cell Transplant*. 2013 Dec;22(12):2267–77.
44. Duijvestein M, Vos ACW, Roelofs H, Wildenberg ME, Wendrich BB, Verspaget HW, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*. 2010 Dec;59(12):1662–9.
45. Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*. 2011 Jun 1;60(6):788–98.
46. Mardešić D. *Pedijatrija*. Osmo, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 2016.
47. Petković D, Barić I. Liječenje mukopolisaharidoza. *Paediatr Croat*. 2005;49(3).
48. Kavaliunaite E, Aurora P. Diagnosing and managing bronchiolitis obliterans in children. *Expert Rev Respir Med*. 2019 May 4;13(5):481–8.
49. Bondeelle L, Bergeron A. Managing pulmonary complications in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Respir Med*. 2019 Jan 2;13(1):105–19.
50. Chien JW, Duncan S, Williams KM, Pavletic SZ. Bronchiolitis Obliterans Syndrome After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation—An Increasingly Recognized Manifestation of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Jan;16(1):S106–14.
51. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Mar;21(3):389-401.e1.
52. Williams KM. How I treat bronchiolitis obliterans syndrome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2017 Jan 26;129(4):448–55.
53. Bonfield TL, Nolan (Koloze) MT, Lennon DP, Caplan AI. Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo. *J Inflamm*. 2010;7(1):51.

54. Inamdar AC, Inamdar AA. Mesenchymal stem cell therapy in lung disorders: Pathogenesis of lung diseases and mechanism of action of mesenchymal stem cell. *Exp Lung Res.* 2013 Oct;39(8):315–27.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24. veljače 1996. u Zaboku. Nakon završene Osnovne škole Lijepa naša u Tuhlju upisala sam Gimnaziju Antuna Gustava Matoša u Zaboku, prirodoslovno-matematički smjer.

Tijekom srednjoškolskog obrazovanja bila sam aktivni član KUD-a Naša lipa Tuhelj (zbor i dramska sekcija) te Puhačkog orkestra Lipa Tuhelj, s kojima sam više puta sudjelovala na državnim amaterskim smotrama, a čiji sam član i dan danas.

2014. godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom fakulteta uključila sam se u demonstratorski rad te sam bila demonstrator na Zavodu za histologiju i embriologiju (2015./2016.), Zavodu za internu medicinu u sklopu predmeta Klinička propedeutika (2018./2019. i 2019./2020.) te na Klinici za pedijatriju – odjel metabolizma (2019./2020.). Dekanovu nagradu za odličan uspjeh na studiju dobila sam za ak.god. 2018./2019. Aktivna sam članica Studentske sekcije za pedijatriju, s kojom sam 2019. sudjelovala na 36. Hrvatskoj proljetnoj pedijatrijskoj školi u Splitu te 2020. na 6. NIP (Novi izazovi u pedijatriji) u Vodicama. Članica sam udruge StEPP - Studentske ekipe prve pomoći, s kojima redovito sudjelujem na brojnim volonterskim aktivnostima kojima je cilj educirati studente Medicinskog i Stomatološkog fakulteta te laike o osnovama zbrinjavanja hitnih stanja. Volontirala sam na Klinici za dječje bolesti Zagreb kao član Centra Pričaj mi, centra za psihološku podršku i razvoj djece. Članica sam Sekcije mladih Hrvatskog liječničkog katoličkog društva te sam 2018. sudjelovala na 25. kongresu Svjetskog saveza liječnika katolika u Zagrebu. Bila sam pasivna sudionica 2017. i 2018. na Croatian Student Summitu (CROSS) u Zagrebu. Aktivno se služim engleskim i njemačkim jezikom u govoru i pismu. Koristim se svim Microsoft Office alatima.