

VYUŽITIE MEZENCHYMÁLNYCH KMEŇOVÝCH BUNIEK ZÍSKANÝCH Z TUKOVÉHO TKANIVA V LIEČBE DIABETES MELLITUS

Brezina J.¹, Radoňak J.¹, Hildebrand T.¹, Bačenkova D.², Trebuňová M.², Petrášová D.³

¹ I. chirurgická klinika, UPJŠ LF a UNLP, Košice
² Katedra biomedicínskeho inžinierstva, TUKE Sjf, Košice
³ Laboratórium výskumných biomodelov, UPJŠ LF, Košice

Cieľ Cieľom tejto práce bolo posúdiť možnosti implantácie kmeňových buniek diabetickým potkanom a následne zhodnotiť schopnosť týchto buniek ovplyvniť príznaky diabetes mellitus.

Materiál a metodika Intraperitoneálne podanie streptozotocínu je vhodnou a efektívnou metódou indukcie diabetes mellitus u potkana. Schopnosť implantovaných mezenchymálnych kmeňových buniek (MSC) diferencovať sa na inzulín produkujúce bunky je možné sledovať na úprave príznakov diabetes mellitus – glykemický profil a hmotnosť.

Výsledky Zistili sme, že mezenchymálne kmeňové bunky majú v diabetickom prostredí schopnosť diferencovať sa na inzulín produkujúce bunky, čo sa prejaví úpravou glykemických profilov a hmotností laboratórnych zvierat.

Záver Naše výsledky podporujú možnosti využitia kmeňových buniek v liečbe diabetes mellitus.

Kľúčové slová: potkan, diabetes mellitus, mezenchymálne kmeňové bunky

Úvod

Diabetes mellitus 1. typu je ochorenie na autoimunitnom podklade, ktoré spôsobuje progresívnu deštrukciu pankreatických β buniek a v konečnom dôsledku vedie k strate schopnosti vylučovať inzulín, čo vedie k hyperglykémii. Hyperglykémia u diabetikov môže viesť k početným život ohrozujúcim komplikáciami – najmä ku kardiovaskulárnym ochoreniam, ochoreniam obličiek, nervov, očí a ďalším.

K jej liečbe môže viesť náhrada poškodených β buniek bunkovou terapiou. Súčasne dostupné stratégie liečby sú inzulínoterapia a transplantácia pankreasu, prípadne Langerhansových ostrovčekov. Pre transplantáciu je potrebný mŕtvy darca a nesie so sebou mnohé nedostatky, vrátane celoživotnej imunosupresívnej terapie a s ňou spojenými nežiaducimi účinkami. Terapie kmeňovými bunkami poskytujú nové možnosti liečby diabetes mellitus 1. typu. Kmeňové bunky majú za vhodných podmienok potenciál diferencovať sa na inzulín produkujúce bunky a zároveň vyhnúť sa rejekcii imunitným systémom. Otázkou však zostáva optimálne miesto implantácie kmeňových buniek za účelom najlepšieho efektu a náhrady funkcie deštruovaných β buniek. Potrebné je stanoviť tiež najvhodnejšiu dávku, prípadne potrebu opakovania implantácie pre čo najlepšiu kontrolu glykémie, a tým prevenciu komplikácií vychádzajúcich z diabetes mellitus.

Kmeňové bunky sú charakterizované dvomi hlavnými vlastnosťami - ako bunky bez špecializácie sa dokážu deliť a obnovovať po dlhú dobu bez toho, aby sa diferencovali na iný typ bunky a zároveň sa prezentujú potenciálom vyvinúť sa na mnohé špecializované bunkové typy pod vplyvom určitých fyziologických alebo experimentálnych podmienok. Takýto proces môže byť vyvolaný rôznymi signálmi, či už internými (ako napr. génová expresia) alebo externými (napr. fyzický kontakt, chemické vplyvy alebo mikromolekuly prostredia) [18]. Táto indukcia vedie následne k špecializácii bunky prostredníctvom reštrikcie a expresie kľúčových génov. Potreba neobmedzenej zásoby náhradných inzulín produkujúcich β buniek

viedla k výskumu vhodnosti kmeňových alebo progenitorových buniek za účelom tvorby inzulín produkujúcich buniek. Hlavnou úlohou týchto bunkových terapií bolo znížiť reguláciu imunitného systému a prerušiť alebo aspoň spomaliť proces autoimunitnej deštrukcie týchto buniek. [31]. Ďalším cieľom bolo získať kmeňové bunky a diferencovať ich na funkčné, inzulín produkujúce β bunky / β bunkám podobné bunky za účelom liečby diabetes mellitus 1. typu. Hlavným cieľom tejto terapie je dosiahnuť stabilné, normalizované hodnoty glykémie, a tým elimináciu ťažkých hypoglykemických príhod, a tak zlepšiť kvalitu života a zároveň predísť dlhodobým komplikáciami diabetu za súčasnej redukcie až eliminácie nežiaducich účinkov spojených s touto liečbou [32].

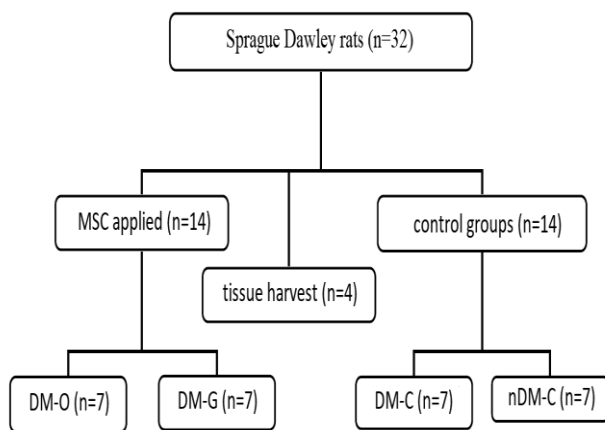
Materiál a metódy

Súčasťou experimentu bolo 32 klinicky zdravých potkanov samcov rodu Sprague Dawley vo veku 10 mesiacov. Ich úvodná hmotnosť bola 530 až 610 gramov. Na úvod experimentu boli zvolené 4 potkany, ktorým bolo odobraté tukové tkanivo omenta za účelom odberu a získania MSC. Ostatných 28 potkanov bolo náhodne rozdelených do rovnako veľkých 4 skupín nasledovne: diabetické potkany s aplikáciou MSC do omenta (DM-O), s aplikáciou MSC do steny žalúdka (MSC-G), diabetická kontrolná skupina bez aplikácie MSC (DM-C) a nediabetická kontrolná skupina bez podania MSC (nDM-C). Schematické rozdelenie potkanov v experimente je zobrazené na obrázku 1.

Diabetes bol v skupinách potkanov DM-O, DM-G a DM-C indukovaný administráciou streptozotocínu (STZ) (Biosynth – Carbosynth, UK) v dávke 60mg/kg intraperitoneálne. Streptozotocín bol pred aplikáciou rozpustený v citrátovom pufrí s pH 4,5 a podaný po 15 minútach. Vzorky krvi počas celého experimentu boli získavané zo žily chvosta potkanov. Na vyšetrenie hodnôt glykémie bol používaný glukomer TD-4116 Next. Kontrola indukcie diabetu u potkanov bola realizovaná vyšetrením glykemických profilov od 3. do 7. dňa aplikácie STZ raz za dva dni v rovnakom čase. U všetkých experimentál-

nych potkanov bol na 7. deň po aplikácii STZ dokázaný diabetes, čo potvrdili hodnoty glykémie nad $24,3 \pm 3,2$ mmol/l. ($P < 0,0001$). Súčasne bola pozorovaná aj hmotnosť potkanov vo všetkých diabetických skupinách, pričom vo všetkých troch bol pozorovaný signifikantný pokles hmotnosti ($P < 0,0001$). Za účelom operačného získania tkanív na izoláciu MSC boli potkany anestetizované intramuskulárnym podaním zoletilu (Tietamin, Zolazepam) v dávke 50 mg/kg. Tukové tkanivo za účelom získania MSC bolo získané odobratím omenta potkana. Analgézia v pooperačnom období bola zabezpečená intramuskulárnym podávaním tramadol hydrochloride v dávke 5mg/kg, a to každých 24 hodín po dobu troch dní od operácie. Experimentálne zvieratá boli počas celého experimentu držané samostatne v klietkach s neobmedzeným prístupom ku vode a s čiastočne obmedzeným prístupom ku potrave, a to v závislosti od plánovaných vyšetrení, event. chirurgického zákroku. Vyšetrenia, chirurgické zákroky a následná starostlivosť o zvieratá boli realizované pod dohľadom a v priestoroch Laboratória výskumných biomodelov, UPJŠ LF (Košice, Slovensko).

Figure 1 Experimental groups. The classification of 32 experimental rats into groups



Za účelom aplikácie boli MSC získané z tukového tkaniva 4 potkanov rodu Sprague Dawley s podobnými vlastnosťami (vek, hmotnosť) ako ostatné potkany v experimente. Mezenchymálne kmeňové bunky boli izolované z tukového tkaniva omenta 8 mesačných laboratórných potkanov. Tukové tkanivo bolo uložené v Dulbecco's eagle's Minimal Essential Medium (DMEM) 4.5g/L Glucose (Thermo Fisher Scientific Lonza) s antibiotic-antimycotic (Thermo Fisher Scientific) do spracovania v chlade. Tukové tkanivo bolo prepláchnuté s DMEM médiom s antibiotikami Gentamicin (Sandoz). Tkanivo bolo v sterilných podmienkach laminárneho boxu mechanicky frakcionované na kúsky s rozmermi cca 3-5 mm a prenesené do tráviaceho enzýmu collagenase type IV. (Thermo Fisher Scientific).

Doba pôsobenia enzýmu bola cca 30 min pri 37° C. Po 30 minútach došlo ku natráveniu tkaniva a uvoľnenia buniek. Roztok bol prefiltrovaný bunkovým sitkom s priemerom pórov 40 μm (Falcon). Bunková suspenzia bola premytá s DMEM médiom a centrifugovaná pri 1300 ot./4 °C 10 min. Izolované bunky boli resuspendované

v kompletom kultivačnom médiu DMEM s 10 % fetálnym bovinným sérom (FBS) (Thermo Fisher Scientific) s 1 % antibiotic-antimycotic do 25 cm² adherentnej kultivačnej fľaše (TPP) v koncentrácii 50. 000 buniek /cm². MSCs boli kultivované v CO₂ inkubátore pri teplote 37 °C a 5 % CO₂ počas 1 až 2 týždňov. Médium bolo menené každé 2 až 3 dni.

Po dosiahnutí 80 % konfluencie boli MSCs pasážované nasledujúcim spôsobom. Kultivačné médium bolo odsaté a pridaný bol roztok 0,25 % trypsin-EDTA. MSCs sa nechali inkubovať cca 2-3 min pri 37°C pričom došlo k uvoľneniu a oddeleniu buniek. Bunková suspenzia bola odsatá a premytá v DMEM médiu a centrifugovaná pri 1300 ot./4 °C 10 min. Po prvej pasáži boli MSCs nasadené na kultivačnú fľašu s plochou 75 cm² a kultivované v kompletom DMEM médiu s FCS a ATB pri 37°C a 5 % CO₂ atmosfére. Po dosiahnutí 70% konfluencie boli bunky trypsinizované a premyté. Stanovená bola 98 % životnosť MSCs po pasáži farbením trypanovou modrou. Na aplikáciu bola pripravená suspenzia MSCs AT v médiu DMEM s ATB v koncentrácii 5 x 10⁵/ ml.

Prietokovou cytometriou bola stanovená expresia charakteristických markerov MSCs (Obr.2). Cytometrická analýza bola vykonávaná na Univerzite veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach. Na jednu analýzu bola pripravená suspenzia cca 200 tisíc buniek. Suspenziu MSCs po trypsinizácii bola premytá s 3 až 5 ml PBS s 2 % FCS a centrifugovaná pri 1500 ot 7 min. Bol pridaný odporučený počet buniek cca 200 tisíc na analýzu každého stanoveného markera. K suspenzii 200 tisíc bolo pridaných 5 μl protilátky značenej fluorochromom CD90 PE (Invitrogen - 17590042), CD73 FITC (LSBio - C 472662), CD44 PE (Therom - 19781), CD29 PE (Thermo -MEM 101A), CD45 PE (Thermo -MA1 81225). Po inkubácii s protilátkami bola suspenzia značených buniek premytá. FACS analýza bola stanovená prietokovým cytometrom FACS Canto, Becton Dickinson.

Experimentálne potkany zo skupín DM-O, DM-G a DM-C boli pred chirurgickým zákrokom odstavené od stravy po dobu 12 hodín. Anestézia počas výkonu bola zabezpečená intramuskulárnym podaním Zoletilu (tietamin, zolazepam) v dávke 50mg/kg. Prístup do brušnej dutiny bol realizovaný pozdĺžnym rezom v strednej čiare, vizualizované bolo omentum a žalúdok potkana. Suspenzia MSC bola následne podaná inzulínovou striekačkou do omenta (skupina DM-O) a do steny žalúdka subserózne (skupina DM-G). Obom kontrolným skupinám (DM-C, nDM-C) bol obdobným spôsobom aplikovaný 1ml média DMEM do omenta, resp. do steny žalúdka subserózne. Následne bola brušná stena uzavretá v dvoch vrstvách. Peritoneum so svalovou vrstvou bolo zošité použitím resorbovateľného materiálu (Safil 4/0, B. Braun, Nemecsko) pokračujúcim stehom. Koža potkana bola zašitá pomocou neresorbovateľného monofilamentného vlákna (Dafilon 4/0, B.Braun) pokračujúcim vnoreným stehom. Pooperačne bola potkanom podávaná analgézia použitím tramadol hydrochloride injekcií intramuskulárne v dávke 5mg/kg. V pooperačnom období bol potkanom obnovený prístup k vode a následne i k potrave.

Výsledky

Charakterizácia MSC

Prietokovou cytometriou bol stanovaný fenotyp charakteristický pre MSCs AT: CD90+, CD73 nedetekované, CD44±, CD29± a CD45-. Nasadené izolované MSCs bunky mali adherentný charakter a predĺžený, vretenovitý "spindle shape" tvar. V prvom týždni kultivácie boli prítomné hematopoetické bunky, ktoré nemajú adherentnú schopnosť a po pasáži boli z kultivácie odseparované. MSC mali morfológiu podobnú fibroblastom a tvorili CFU-F kolónie.

Figure 2 Phenotypic characteristics of MSC (zdroj: autor)

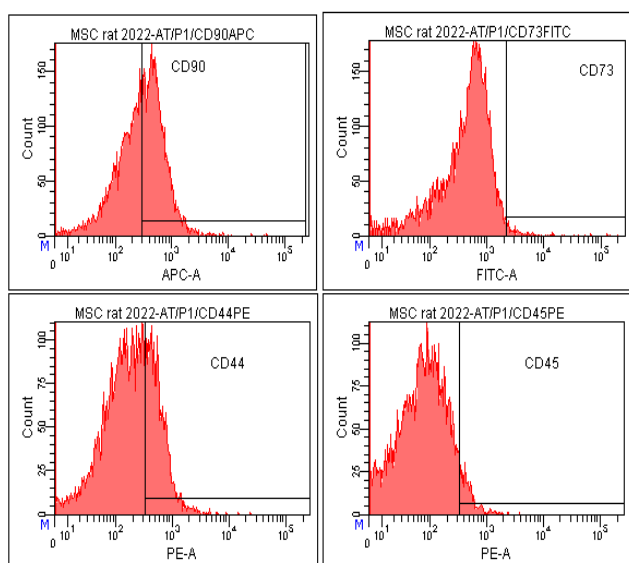
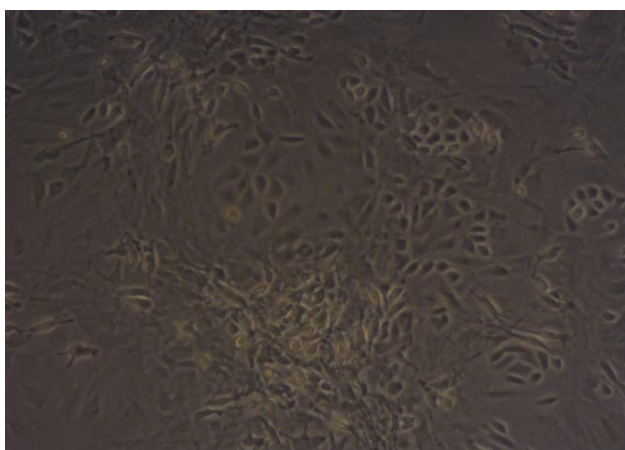


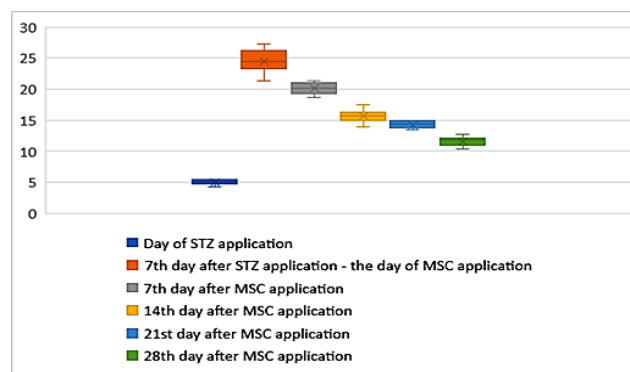
Figure 3 Day 8 of cultivation – MSC show typical elongated shape (zdroj: autor)



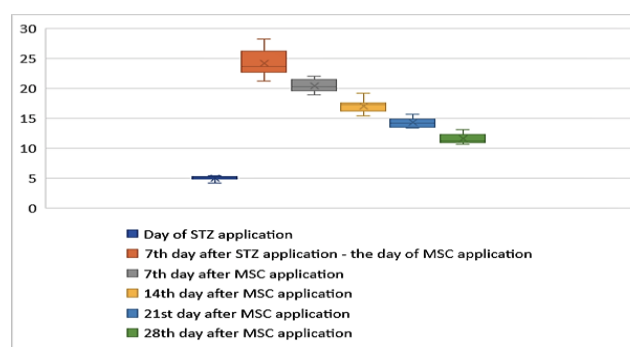
Meranie glykémie experimentálnych zvierat

U experimentálnych potkanov zo skupín DM-O, DM-G a DM-C na siedmy deň po podaní streptozotocínu boli namerané zvýšené hodnoty glykémie s hodnotami $24,24 \pm 3,96$ mmol/l ($P < 0,0001$) (Graf 1 - 3). V nediabetickej kontrolnej skupine boli získané hodnoty glykémie signifikantne nižšie (Graf 4). Hodnoty glykémie, ktoré sme získali na siedmy deň po aplikácii streptozotocínu, ukazujú účinok streptozotocínu na pankreas experimentálnych potkanov, a tým jeho schopnosť vyvolať diabetes.

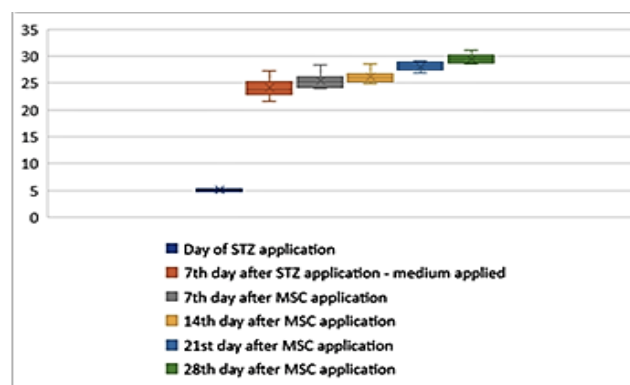
Graph 1 Changes in measured glycemia in rats in DM-O group (mmol/l) (zdroj: autor)



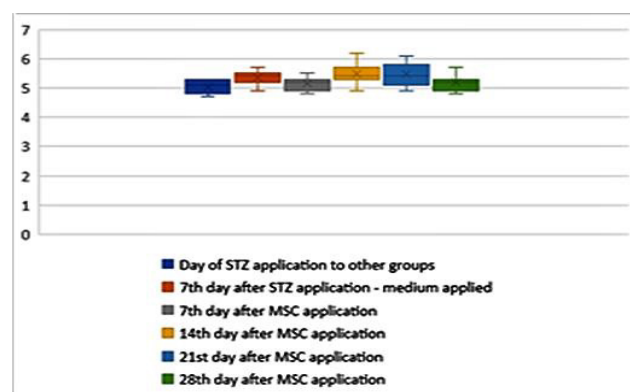
Graph 2 Changes in measured glycemia in rats in DM-G group (mmol/l) (zdroj: autor)



Graph 3 Changes in measured glycemia in rats in DM-C group (mmol/l) (zdroj: autor)



Graph 4 Changes in measured glycemia in rats in nDM-C group (mmol/l) (zdroj: autor)



Po podaní streptozotocínu diabetickým skupinám (DM-G, DM-O a DM-C) sa u potkanov rozvinul diabetes, čo dokazujú zvýšené hodnoty nameraných glykemických profilov na siedmy deň po aplikácii STZ. Po podaní MSC v skupinách DM-G a DM-O sme pozorovali postupný štatisticky významný pokles glykemických profilov, čo ukazujú grafy 1 a 2. Na 28. deň po transplantácii MSC v týchto dvoch skupinách boli namerané glykemické profily priemerne $11,56 \pm 1,55$ mmol/l. Signifikantný rozdiel medzi skupinami, ktoré mali MSC aplikované do omenta a do steny žalúdka zaznamenaný nebol. Potkany v diabetickej kontrolnej skupine (DM-C) vykazovali zvýšené hodnoty glykémie počas celého experimentu so stúpajúcou tendenciou. U potkanov v nediabetickej kontrolnej skupine (nDM-C) hyperglykémie zaznamenané neboli.

Table 1 Weight changes in rats during the experiment (g)

Group	The day of STZ application	The day of MSC application	7th day after MSC application	14th day after MSC application
DM-O	580 ± 50	539 ± 48	550 ± 57	577 ± 55
DM-G	572 ± 40	526 ± 31	533 ± 21	569 ± 29
DM-C	578 ± 37	544 ± 36	552 ± 38	556 ± 36
nDM-C	574 ± 25	576 ± 37	588 ± 27	605 ± 22

(zdroj: autor)

Diskusia

Diabetes mellitus je považovaný za súhrn metabolických syndrómov, pre ktoré je charakteristická hyperglykémia a poruchy metabolizmu sacharidov, proteínov a lipidov. V súčasnosti jeho incidencia vo svete stúpa, čo predstavuje značnú socioekonomickú záťaž pre zdravotníctvo mnohých krajín [21]. Je to ochorenie charakterizované deficienciou v sekrécii inzulínu, ktorý je kľúčovým anabolickým hormónom zohrávajúcim významnú úlohu v kontrole početných metabolických ciest, vrátane metabolizmu sacharidov, ukladaní glykogénu a syntézy mastných kyselín. Rozlišujeme dva bežné typy DM – DM I. typu a DM II. typu. DM I. typu je opisovaný ako totálny nedostatok inzulínu vzhľadom na poškodenie pankreatických beta buniek, zatiaľ čo DM II. typu je spôsobený prevažne inzulínovou rezistenciou v dôležitých orgánoch, akými sú pečeň, sval a tukové tkanivo. DM je spojený s radou ťažkých život ohrozujúcich komplikácií ako napr. kardiovaskulárne, cerebrovaskulárne ochorenia, neuropatia, nefropatia a retinopatia [28]. Vzhľadom na stúpajúcu incidencia tohto ochorenia, časté sprevádzajúce chronické komplikácie, ale aj dopad na celkové zdravie a sociálnu i ekonomickú záťaž na spoločnosť sme sa zamerali vo výskume na rozvoj možnosti liečby DM.

Pacienti s DM sú často odkázaní na denné podávanie injekcií inzulínu. Napriek moderným možnostiam a úpravám aplikácie inzulínu, exogénna aplikácia nemôže nikdy dosiahnuť presnosť a dynamiku endogénnej sekrécie inzulínu z β -buniek, a teda dokáže iba čiastočne redukovať riziko rozvoja mikro- (nefropatia, retinopatia) a makrovaskulárnych (postihnutie koronárnych artérií, cerebrovaskulárne ochorenia) komplikácií. Obnovenie endogénnej sekrécie inzulínu predstavuje dôležitý cieľ, ktorým by sme obmedzili hyper- a hypoglykémie, ako aj redukovali alebo predišli chronickým komplikáciám DM

Meranie hmotností experimentálnych zvierat

Počas trvania experimentu boli sledované tiež hmotnosti experimentálnych zvierat všetkých skupín. Prvé meranie hmotnosti bolo realizované v deň podania streptozotocínu, ďalšie merania následne každých sedem dní experimentu. Namerané hodnoty ukázali štatisticky signifikantný rozdiel v hmotnosti potkanov v skupinách po aplikácii MSC v porovnaní s diabetickou kontrolou. Medzi získanými hodnotami v dvoch skupinách po podaní MSC sme štatisticky významný rozdiel nezaznamenali. Prehľad vývoja hmotností u laboratórných zvierat je zobrazený v tabuľke č.1.

a nutnosť self-manažmentu pacienta s pravidelnou kontrolou glykémie a podávaním exogénneho inzulínu [24]. Snahou o obnovenie endogénnej sekrécie inzulínu sú transplantácie Langerhansových ostrovčiek, ktoré sa postupne a sústavne vylepšujú so začiatkom v 80. rokoch 20. storočia [25]. Dôležitým krokom bol Edmontonský protokol z roku 1999, ktorý využil sirolimus, takrolimus a daclizumab za účelom imunosupresie [29]. Následný klinický výskum vylepšil techniky izolácie, kultivácie i transplantácie a využitie protizápalových a imunomodulačných prostriedkov. V porovnaní so štandardnou inzulínovou terapiou dokáže transplantácia LI efektívnejšie zlepšiť kontrolu glykémie, kontrolovať rozvoj retinopatie a výskyt epizód hypoglykémie dokonca aj u pacientov, u ktorých bola zachovaná iba parciálna funkcia štepu [12].

Ďalšou zaužívanou alternatívou liečby DM je transplantácia celého pankreasu. Štandardná procedúra s infúziou LI do pečene je však oveľa bezpečnejšia s menším rizikom komplikácií než transplantácia celého pankreasu. Táto je považovaná za rozsiahly operačný výkon s náležitými rizikami pre pacienta, preto je vzácné realizovaná samostatne a väčšinou je kombinovaná s transplantáciou obličky u pacientov s DM a terminálnym štádiom ochorenia obličiek. Hlavným úskalím transplantácie LI je obmedzené prežitie grafu. Multicentrická analýza zahŕňajúca 18 pacientov, u ktorých bolo vykonaných 34 transplantácií LI s prežitím štepu u približne 72,2 %, 44,4 % a 22,2 % prípadov po 1, 2, respektíve 5 rokoch [2]. Transplantácia ostrovčiek od mŕtveho darcu je využívanou formou, avšak v súčasnosti nedokáže pokryť veľký dopyt po takejto liečbe.

Ľudské orgány a tkanivá disponujú obmedzenou kapacitou úplne obnoviť ich štruktúru a funkciu pri viacerých patologických stavoch a degeneratívnych ochore-

niach. Tento fakt viedol k multidisciplinárnemu záujmu o regeneračnú medicínu, ktorá skúma potenciál využitia kmeňových buniek na obnovu tkanív a obnovenie orgánovej funkcie [38]. Na základe ich povahy a pôvodu vykazujú kmeňové bunky vlastnosti, vďaka ktorým nachádzajú uplatnenie v bunkovej terapii. Jedným z ochorení, pri ktorých má výskum využitia kmeňových buniek veľký význam je aj DM. Vo svete prebieha mnoho výskumov a štúdií rôznych terapeutických stratégií, ktoré by vyprodukovali veľké množstvo β -buniek alebo funkčných Langerhansových ostrovciek. Táto zvýšená pozornosť je čiastočne spôsobená stúpajúcou incidenciou DM vo svete. Súčasné štúdie sa venujú viacerým možnostiam využitia kmeňových buniek, medzi ktoré patria napr:

- kmeňové bunky (MSC alebo hematopoetické) s transplantáciou a následnou diferenciáciou na inzulín produkujúce bunky (IPC) (alogénna vs. autológna) [10],
- kmeňové bunky (MSC a/alebo hematopoetické) a nimi modulovaná regenerácia endogénnych ostrovciek [22],
- in vitro modulácia MSC na IPC s následnou transplantáciou/implantáciou (alogénna vs. autológna) [27],
- spoločná transplantácia MSC s intaktnými LI za účelom zlepšenia prežitia a funkcie ostrovciek [7],
- in vitro diferenciácia embryonálnych kmeňových buniek (ESC) na β -bunky s ich následnou enkapsuláciou do polymérov (ako prevencia imunitnej rejekcie) a implantáciou do peritonea [33].

Existujú značné dôkazy u potkanov, oviec aj u ľudí, že sa môžu HSC a MSC diferencovať a prekročiť hranice línií bez fúzie buniek donora a príjemcu [17]. Ianus a kolegovia prví zaznamenali v roku 2003, že transplantované myšie bunky kostnej drene dokázali vytvoriť β -bunky a produkovať inzulín v pankrease príjemcu bez fúzie medzi bunkami darcu a príjemcu [14]. Iskovich et al. následne poskytli podporný dôkaz využitím premytých kmeňových buniek z kostnej drene od darcu [15].

Mezenchymálne kmeňové bunky si našli svoje miesto v regeneračnej medicíne ako potenciálna forma terapie mnohých ochorení a patologických stavov. Hlavnou fascináciou a dôvodom, prečo sa kladie na liečbu pomocou MSC dôraz spočíva v jednoduchosti ich izolácie, veľkej schopnosti ex-vivo expanzie, dokázaných imunomodulačných aktivít a fakt, že sú to multipotentné kmeňové bunky [4]. V porovnaní s MSC je veľmi náročné expandovať množstvo získaných HSC (zvýšiť počet buniek), nakoľko majú väčšiu tendenciu sa diferencovať a strácajú kapacitu samostatne sa obnovovať. Terapeutické využitie ESC vytyčujú tri hlavné problémy – histokompatibilita, malígný potenciál a otázku etiky. Realizované boli aj štúdie s využitím zmiešanej populácie kmeňových buniek [26]. MSC sú využívané v klinickej praxi už od roku 1995 [20]. Ich využitie v praxi je považované za bezpečné a podanie autológnych aj alogénnych MSC je všeobecne dobre tolerované a klinicky efektívne [5]. Jedným z ochorení, ktoré by mohli z postupov v regeneračnej medicíne a využití kmeňových buniek ťažiť je DM. Možným a dostupným zdrojom získania MSC je tukové tkanivo.

Tukové tkanivo je komplexným dynamickým tkanivom, ktoré má aktívnu úlohu ako endokrinný, parakrinný

a autokrinný orgán, čím ovplyvňuje metabolické aktivity rôznych orgánov. Má dôležitú úlohu nielen v imunologickej obrane organizmu, ale takisto v homeostáze glukózy. Tukové tkanivo je dostupným zdrojom mezenchymálnych stromálnych buniek (MSC) a má niekoľko výhod v porovnaní s inými zdrojmi MSC. Medzi hlavné výhody MSC získaných z tukového tkaniva patrí jednoduchý prístup k jeho odberu a veľké množstvo MSC, ktoré je možné z tohto tkaniva získať [8]. MSC derivované z tukového tkaniva (AT-MSC) sa vyznačujú vysokou plasticitou a potenciálom diferenciácie na meso-, ecto- a endodermálne línie [3]. Okrem schopnosti diferencovať sa na rôzne typy buniek vykazujú AT-MSC prospešné terapeutické účinky, akými sú angiogénne, anti-apoptické, anti-fibrotické, imunomodulačné a protizápalové účinky [23]. Navyše AT-MSC uplatňujú svoj imunosupresívny charakter prostredníctvom mechanizmu medzibunkového kontaktu, mediovaného expresiou počtu povrchových bunkových proteínov, ktoré modulujú aktivity imunitných buniek [19]. V súčasnosti sa ukazuje terapia založená na kmeňových bunkách ako sľubná alternatíva doposiaľ zaužívaných foriem liečby DM [36]. Aj keď sa v súčasných štúdiách preferuje prístup s použitím autológnych MSC, funkciu takto získaných MSC negatívne ovplyvňuje stav samotného ochorenia. Diabetes mellitus je spojený s chronickým zápalom nízkeho stupňa, čo vedie k aktivácii pro-zápalovej aktivity AT-MSC a následne k zvýšenej produkcii pro-zápalových cytokínov, a to hlavne IL-1 β a TNF, ktoré hrajú úlohu v patogenéze DM. Tieto údaje naznačujú, že terapeutické využitie autológnych AT-MSC v liečbe DM môže posilniť zápal prítomný pri tomto ochorení, a tým zhoršiť jeho celkový priebeh a mieru komplikácií. Toto zistenie vyvoláva otázky ohľadom bezpečnosti transplantácie autológnych MSC. V súčasnosti sa preto silne odporúča výskum využitia alogénnych AT-MSC (izolovaných od zdravých darcov) za účelom liečby DM. Pri využití alogénnych MSC je však potrebné zamerať sa na imunitnú reakciu príjemcu voči takto získaným transplantovaným MSC. V našom experimente sme využili transplantáciu alogénnych AT-MSC získaných z omenta zdravých darcov.

Za laboratórny model sme si v experimente zvolili potkana rodu Sprague Dawley, diabetes bol indukovaný aplikáciou streptozotocínu intraperitoneálne. Napriek v súčasných štúdiách pomerne častejšie sa vyskytujúcemu modelu spontánne diabetického potkana, popísal Furman využitie streptozotocínu v úlohe látky indukujúcej diabetes mellitus za vhodnú formu zvieracieho modelu s diabetom [9]. Zvolené bolo MSC získané z tukového tkaniva potkanov, ktoré boli ďalej spracované a následne implantované diabetickým potkanom. Abu-Shahba vo svojej štúdií vyzdvihuje možnosť využitia MSC derivovaných z tukového tkaniva a popisuje alogénne MSC ako okamžitú, rýchlo dostupnú, nízko nákladovú a dobre kontrolovateľnú formu zdroja MSC [1]. Počas experimentu sme pozorovali štatisticky významný pokles glykémii v skupinách potkanov, ktorým boli MSC aplikované, a to bez značného rozdielu v závislosti od miesta implantácie (omentum vs. stena žalúdka). Podobné výsledky dosiahol v roku 2008 Qing-Yu Dong, ktorý aplikoval alogénne mezenchymálne kmeňové bunky do pankreasu diabetických potkanov, pričom MSC získal z kostnej drene

potkanov [6]. Alogénne MSC transplantoval aj Gu v roku 2014, pričom zvolil rôzne miesta podania MSC (chvostová žila, pankreas subkapsulárne). Zistil, že v skorých štádiách boli MSC aplikované do chvostovej žily imunoprivilegované a schopné produkcie inzulínu, MSC aplikované do pankreasu v neskorých štádiách experimentu však vyvolali silnú antigénovú imunitnú reakciu [11]. José vo výskume následne sledoval terapeutický potenciál MSC získaných z kostnej drene od diabetických a nediabetických potkanov, pričom výsledky boli porovnateľné [16]. V rôznych štúdiách však boli pozorované účinky MSC u diabetických potkanov nielen na hmotnosť a glykemické profily zvierat, ale na iné komplikácie DM. Wartchow vo svojej štúdií opísala pozitívny protektívny efekt MSC u diabetických potkanov pred kognitívnymi poruchami, pričom MSC aplikovala subkutánne a subkapsulárne do obličky [34]. Pozitívny efekt MSC derivovaných z tukového tkaniva preukázal aj Yan, ktorý pozoroval terapeutický účinok na erektilnú dysfunkciu pri podaní MSC diabetickým potkanom [35]. Nami získané výsledky, ale aj vyššie spomínané štúdie naznačujú, že transplantované MSC majú pozitívny efekt nielen na glykemický profil a hmotnosť experimentálnych zvierat, ale i na pridružené komplikácie DM.

V súčasnosti je množstvo ľudských pacientov, ktorí sú súčasťou štúdií relatívne nízke. Celkovo sa sledovalo 276 pacientov v malých skupinách v 3 rôznych štádiách [13, 30, 38]. Pacienti mali rôzny vek, BMI a iné aspekty, ako aj trvanie a stupeň ochorenia. Aplikované MSC taktiež pochádzali z rôznych zdrojov – kostná dreň, tukové tkanivo, pupočník a boli spracované rozličným spôsobom a podané v rôznych dávkach. Aj keď MSC ani v jednom prípade DM nevylicovali, prekvapivo boli zaznamenané rôzne pozitívne aspekty a dosiahnuté boli parciálne zlepšenia hladín glykémie.

Súhrne možno konštatovať, že výskumy ukazujú, že aj heterogénne populácie MSC môžu byť klinicky efektívne. Otázkou zostáva, či je možné zlepšiť klinický výsledok tejto terapie, nakoľko v skutočnosti zatiaľ neexistuje štandardizovaná metóda na odber, izoláciu, charakterizáciu, expanziu a testovanie potencie MSC. Terapia kmeňovými bunkami má stále široké spektrum obmedzení, s ktorými sa musí vysporiadať, a ktoré sú stále predmetom výskumov. MSC sú klinicky bezpečné, a aj keď samotný DM nevylicia, ich potenciál uľahčiť priebeh DM a obmedziť jeho komplikácie je veľký, nakoľko väčšina štúdií ukázala pri ich využití zníženu potrebu podávania exogénneho inzulínu a/alebo antidiabetík. V tomto zmysle majú MSC uplatnenie v súčasnosti hlavne u diabetických pacientov, u ktorých je veľký problém s kontrolovaním glykémie konvenčnými metódami, napr. pacienti s nestabilným – „brittle“ diabetom.

Záver

Naším cieľom bolo zvoliť vhodnú technológiu implantácie kmeňových buniek, porovnať rôzne miesta ich implantácie, sledovať prežívanie a pomocou pravidelného monitoringu glykemických profilov a hmotnostného stavu experimentálnych zvierat dokázať schopnosť MSC diferencovať sa na inzulín produkujúce bunky a tým pozitívne vplývať na stav DM v experimentálnom modeli. Počas

trvania nášho experimentu a po jeho ukončení, sme priebežne pozorovali postupný štatisticky významný pokles koncentrácií glykémie v skupinách potkanov, ktorým boli MSC aplikované. Pozitívny efekt MSC na priebeh DM sme sledovali aj pri posudzovaní hmotnosti potkanov.

Výsledky experimentu ukazujú, že nie je štatisticky signifikantný rozdiel v koncentráciách glykémie a hmotnosti medzi skupinami liečenými MSC, čo značí, že funkcia MSC a ich schopnosť diferencovať sa na IPC nie je ovplyvnená miestom ich aplikácie (omentum vs. stena žalúdka). Táto práca podporuje uplatnenie kmeňových buniek a ich miesto v liečbe diabetes mellitus, potrebné je však pokračovať vo výskume ich uplatnenia a možného implementovania do klinickej praxe.

Zoznam skratiek

ATB - antibiotiká
DM - diabetes mellitus
EDTA - Kyselina etyléndiamínotetraoctová
IPC - inzulín produkujúce bunky
LI - Langerhansove ostrovčeky
MSC - mezenchymálne kmeňové bunky
STZ - streptozotocín

Literatúra

1. Abu-Shahba, N., Mahmúdová, M., El-Erian, A.M. et al.: Impact of type 2 diabetes mellitus on the immunoregulatory characteristics of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 140, 2021, 106072, doi: 10.1016/j.biocel.2021.106072.
2. Anazawa, T., Saito, T., Goto, M. et al.: Long-term outcomes of clinical transplantation of pancreatic islets with uncontrolled donors after cardiac death: a multicenter experience in Japan. *Transplant Proc.* 46, 2014, (6):1980-984. doi: 10.1016/j.transproceed.2014.06.006
3. Baer, P., Geiger, H. et al.: Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2012. doi: 10.1155/2012/812693
4. Carvalho, A.M., Nunes, R., Sarmiento, B. et al.: From pluripotent stem cells to bioengineered islets: A challenging journey to diabetes treatment. *Eur J Pharm Sci.* 1, 172, 2022. doi: 10.1016/j.ejps.2022.106148.
5. Dave, S.D., Vanikar, A.V., Trivedi, H.L. et al.: Novel therapy for insulin-dependent diabetes mellitus: infusion of in vitro-generated insulin-secreting cells. *Clin Exp Med.* 15, 2015, (1):41-5. doi: 10.1007/s10238-013-0266-1.
6. Dong, Q.Y., Chen L., Gao, G.Q., Wang, L. et al.: Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat. *Clin Invest Med.* 31, 2008, (6):328-37. doi: 10.25011/cim.v31i6.4918.
7. English, K. et al.: Mesenchymal stem cells to promote islet transplant survival. *Curr Opin Organ Tran-*

- splant. 21, 2016, (6):568-73. doi: 10.1097/MOT.0000000000000359.
8. Frese, L. Dijkman, P.E., Hoerstrup, S.P. et al.: Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine. *Transfus Med Hemother.* 43, 2016, (4):268-74. doi: 10.1159/000448180.
 9. Furman, B.L. et al.: Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc.* 1, (4):e78, 2021. doi: 10.1002/0471141755.ph0547s40.
 10. Goodrich, A.D. Ersek, A., Varain, N.M. et al.: In vivo generation of beta-cell-like cells from CD34 (+) cells differentiated from human embryonic stem cells. *Exp Hematol.* 38, 2010, (6):516-25. doi: 10.1016/j.exphem.2010.03.002.
 11. Gu, L.H. Zhang, T.T., Li, Y. et al.: Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells transplanted via different routes in diabetic rats. *Cell Mol Immunol.* 2015, (12):444-55. doi: 10.1038/cmi.2014.70
 12. Holmes-Walker, D.J., Gunton, J.E., Hawthorne, W. et al.: Islet transplantation provides superior glycaemic control with less hypoglycemia compared with continuous subcutaneous insulin infusion or multiple daily insulin injections. *Transplantation.* 101, 2017, (6):1268-275. doi: 10.1097/TP.0000000000001381.
 13. Hu, J., Wang, Y., Gong, H. et al.: Long term effect and safety of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on type 2 diabetes. *Exp Ther Med.* 12, 2016, (3):1857-866. doi: 10.3892/etm.2016.3544.
 14. Ianus, A., Holz, G.G. Theise, N.D. et al.: In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest.* 111, 2003, (6):843-850. doi: 10.1172/JCI16502.
 15. Iskovich, S. Goldenberg-Cohen, N., Stein, J. et al.: Elutriated stem cells derived from the adult bone marrow differentiate into insulin-producing cells in vivo and reverse chemical diabetes. *Stem Cells Dev.* 21, 2012, (1):86-96. doi: 10.1089/scd.2011.0057.
 16. José, V.S.S., Monnerat, G., Guerra, B. et al.: Bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) from diabetic and nondiabetic rats have similar therapeutic potentials. *Arg Bras Cardiol.* 109, 2017, (6):579-89. doi: 10.5935/abc.20170176.
 17. Körbling, M., Katz, R.L., Khanna, A. et al.: Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med.* 346, 2002, (10):738-46. doi: 10.1056/NEJMoa3461002.
 18. Krentz, N.A.J. et al.: Improvements in stem cell to beta-cell differentiation for the treatment of diabetes. *J Immunol Reg Med.* 12, 2021. doi: 10.1016/j.regen.2021.100043.
 19. Lavi, F. et al.: The effects of adipose tissue mesenchymal stem cells (AT-MSCs) on immunological patterns in females with multiple sclerosis. *Cytotherapy.* 24, 2022, (5):68. doi: 10.1016/S1465-3249(22)00211-0.
 20. Lazarus, H.M., Haynesworth, S.E., Gerson, S.L. et al.: Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant.* 16, 1995, (4):557-64. PMID: 8528172.
 21. Lin, X., Xu, Y., Pan, X. et al.: Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. *Sci Rep.* 10, 2020, (1):14790. doi: 10.1038/s41598-020-71908-9.
 22. Murai, N., Ohtaki, H., Watanabe, J. et al.: Intra-pancreatic injection of human bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells alleviates hyperglycemia and modulates the macrophage state in streptozotocin induced type 1 diabetic mice. *PLoS One.* 12, 2017, (10):e0186637. doi: 10.1371/journal.pone.0186637.
 23. Orbay, H., Tobita, M., Mizuno, H. et al.: Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells Int.* 2012. doi: 10.1155/2012/461718.
 24. Páth, G., Perakakis, N., Mantzoros, C.H.S. et al.: Stem cells in the treatment of diabetes mellitus – focus on mesenchymal stem cells. *Metabolism.* 90, 2019, (1):1-15. doi: 10.1016/j.metabol.2018.10.005.
 25. Pepper, A.R., Bruni, A., Shapiro, A.M.J. et al.: Clinical islet transplantation: is the future finally now? *Curr Opin Organ Transplant.* 23, 2018, (4):428-39. doi: 10.1097/MOT.0000000000000546.
 26. Pixley, J.S., et al.: Mesenchymal stem cells to treat type 1 diabetes. *Biochim Biophys Acta Mol Basic Dis.* 1866, 2020, (4):165315. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.10.033.
 27. Rekitke, N.E., Ang, M., Rawat, D. et al.: Regenerative therapy of type 1 diabetes mellitus: From pancreatic islet transplantation to mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* 3764681, 2016. doi: 10.1155/2016/3764681.
 28. Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P. et al.: Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 157, 2019. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843.
 29. Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A. et al.: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 343, 2000, (4):230-38. doi: 10.1056/NEJM200007273430401.
 30. Skyler, J.S., Fonseca, V.A., Segal, K.R. et al.: Allogeneic mesenchymal precursor cells in type 2 diabetes: a randomized, placebo-controlled, dose-

- escalation safety and tolerability pilot study. *Diabetes Care*. 38, 2015, (9):1742-1749. doi: 10.2337/dc14-2830.
31. Steele, J.A.M., Hallé, J.P., Poncelet, D. et al.: Therapeutic cell encapsulation techniques and applications in diabetes. *Adv Drug Deliv Rev*. 67-68, 2014, (1):74-83. doi: 10.1016/j.addr.2013.09.015.
32. Takahashi, Y., Takebe, T., Taniguchi, H. et al.: Engineering pancreatic tissues from stem cells towards therapy. *Regen Ther*. 1, 2016, (3):15-23. doi: 10.1016/j.reth.2016.01.002.
33. Vegas, A.J., Veiseh, O., Gürtler, M. et al.: Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. *Nat Med*. 22, 2016, (3):306-11. doi: 10.1038/nm.4030.
34. Wartchow, K.M., Rodrigues, L., Lissner, L.J. et al.: Insulin-producing cells from mesenchymal stromal cells: Protection against cognitive impairment in diabetic rats depends upon implant site. *Life Sci*. 251, 2020. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117587.
35. Yan, H., Ding, Y., Lu, M. et al.: Current status and prospects in the treatment of erectile dysfunction by adipose-derived stem cells in the diabetic animal model. *Sex Med Rev*. 8, 2020, (3):486-91. doi: 10.1016/j.sxmr.2019.09.006.
36. Yang, Y., Lei, T., Bi, W. et al.: The combined therapy of mesenchymal stem cell transplantation and resveratrol for diabetes: Future applications and challenges. *Life Sci*. 15, 2022, (301):120563. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120563.
37. Zhao, Y., Jiang, Z., Zhao, T. et al.: Targeting insulin resistance in type 2 diabetes via immune modulation of cord blood-derived multipotent stem cells (CB-SCs) in stem cell educator therapy: phase I/II clinical trial. *BMC Med*. 9, 2013, (11):160. doi: 10.1186/1741-7015-11-160.
38. Zhao, Y., Knight, C.M., Jiang, Z. et al.: Stem cell educator therapy in type 1 diabetes: From the bench to clinical trials. *Autoimmun Rev*. 21, 2022, (5):103058. doi: 10.1016/j.autrev.2022.103058.

THE USE OF ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE TREATMENT OF DIABETES MELLITUS

Brezina J., Radoňak J., Hildebrand T., Bačenkova D., Trebuňová M., Petrášová D.

The aim The aim of presented work was to assess the possibilities of stem cell implantation to diabetic rats and subsequently evaluate the ability of these cells to affect the symptoms of diabetes mellitus.

Material and Methods Intraperitoneal application of streptozotocin is viable and effective method of inducing diabetes mellitus in rats. The ability of implanted mesenchymal stem cells to differentiate into insulin producing cells can be reflected in changes of diabetes mellitus signs – glycemic profile and weight.

Results Based on our results, we concluded that mesenchymal stem cells in diabetic environment possess the ability to differentiate into insulin producing cells, what results into correction of glycemic profiles and weight of laboratory animals.

Conclusion Our findings support the possibility of utilizing the stem cells in treatment of diabetes mellitus.

Key words: rat, diabetes mellitus, mesenchymal stem cells

Žiadny z autorov nemá potencionálny konflikt záujmov.

MUDr. Jozef Brezina, PhD.
I. chirurgická klinika UPJŠ LF a UNLP v Košiciach
Trieda SNP 1, 04011, Košice
Email: brezinamudr@gmail.com