

Komórki macierzyste w leczeniu złamań towarzyszących osteoporozie – medyczne *science fiction* czy metoda terapii w przyszłości?

Stem cells in the treatment of osteoporotic fractures – medical science fiction or a therapy method in the future?

Ewelina Grywalska¹, Agnieszka Grafka², Lechosław Putowski³, Maciej Łopucki², Jacek Roliński¹

¹Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie; kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. med. Jacek Roliński

²Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie; kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Jan Kotarski

³Katedra i Klinika Ginekologii i Endokrynologii Ginekologicznej; kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Lechosław Putowski

Przeгляд Menopauzalny 2011; 5: 378–382

Streszczenie

Osteoporoza jest chorobą rozpoczynającą się od 4. dekady życia, rozpowszechnioną zwłaszcza w populacji kobiet. Największą utratę masy kostnej obserwuje się w okresie okołomenopauzalnym i pomenopauzalnym, co związane jest ze zmniejszonym stężeniem estrogenów w tym okresie życia kobiety. Nasilenie utraty masy kostnej rozpoczyna się średnio 2–3 lata przed ostatnim krwawieniem miesięcznym. Wtedy też dochodzi do zmniejszenia syntezy tych hormonów, co uważane jest za najważniejszy element złożonej patogenyzy osteoporozy. Hipoeostrogenizm powoduje bowiem wzmożenie destrukcyjnej aktywności osteoklastów oraz hamuje czynność osteoblastów. Postępujące z wiekiem osłabienie struktur kostnych może być również konsekwencją zmniejszenia ilości osteoblastów, do którego dochodzi z powodu osłabienia funkcji różnicujących komórek osteoprogenitorowych.

Ryzyko przetrwania ciągłości tkanki kostnej, nawet w następstwie niewielkiego urazu zwiększa się jednak znacząco w okresie pomenopauzalnym.

Pomimo szybkiego postępu w zakresie technik implantacyjnych i przeszczepów kostnych ciągle istnieje potrzeba poszukiwania innych niż tylko chirurgiczne i ortopedyczne sposobów walki ze złamaniami towarzyszącymi osteoporozie.

Terapia komórkowa, bez wątplenia, otwiera nowe możliwości lecznicze. Użycie dojrzałych komórek, takich jak osteoblasty, związane jest z pewnymi problemami. Zalicza się do nich trudności w pozyskaniu komórek, powikłania u dawców, a także ich słaby potencjał proliferacyjny. Natomiast komórki mezenchymalne, pozyskane ze szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej, stanowiące progenitory m.in. osteoblastów, mogą znaleźć zastosowanie w regeneracji kości.

Niniejsza praca ma na celu przedstawienie możliwości terapeutycznych, jakie niesie stosowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w leczeniu złamań osteoporotycznych.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, menopauza, osteoporoza, złamania.

Summary

Osteoporosis is typically a disease of the elderly, and with population aging it has become one of the most frequent and relevant health problems in this age bracket, especially among women. The greatest loss of bone mass occurs in women during perimenopause and is associated with oestrogen deficiency. The age-related decrease in bone mass could also reflect decreased osteoblasts secondary to an age-related loss of osteoprogenitors.

The risk of fractures increases as women pass through the menopause. Osteoporotic fractures are associated with a profound temporary, and sometimes permanent, impairment of function and quality of life.

Despite the rapid evolution of implant technologies and bone grafting techniques, there is still a great demand for novel bone replacement strategies. Cell replacement therapies represent an alternative solution. The

use of mature cells such as osteoblasts is associated with several disadvantages such as the limited availability, donor site morbidity, dedifferentiation, and restricted proliferation potential. Bone marrow or adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, which are the developmental progenitors for osteoblasts and for several other cell types, have been discovered for bone regeneration purposes.

This review presents the possible applications of mesenchymal stem cells in the treatment of osteoporotic fractures.

Key words: stem cells, menopause, osteoporosis, fractures.

Wstęp

U kobiet proces starzenia jest nieodłącznie związany z menopauzą. Terminem tym określa się ostatnie fizjologiczne krwawienie miesięczne, po którym przez okres 12 miesięcy nie występuje i nie stwierdza się przy tym żadnych patologicznych przyczyn takiego stanu organizmu [1]. Ten naturalny etap w życiu każdej kobiety, występujący niezależnie od liczby przebytych porodów czy warunków socjoekonomicznych [2], jest konsekwencją zaniku aktywności pęcherzyków jajnikowych, w związku z czym zmniejsza się biosynteza estrogenów. Stopień zmniejszenia stężenia estrogenów decyduje o rozwoju objawów klimakterycznych, czyli indywidualnych i niejednorodnych zespołów objawów zarówno somatycznych, jak i psychosomatycznych mających negatywny wpływ na jakość życia kobiet [3, 4]. Objawy okresu menopauzy dotyczą zwłaszcza zmian w układzie moczowo-płciowym, krążenia, mięśniowym, a także kostnym [4]. Niezwykle istotne jest szybkie diagnozowanie poszczególnych schorzeń oraz ich leczenie.

W niniejszej pracy autorzy przedstawili nowatorskie badania z zastosowaniem komórek macierzystych, które w przyszłości mogą stanowić alternatywę dla stosowanych obecnie metod walki z konsekwencjami osteoporozy, stanowiącej jedną z najczęściej występujących chorób w okresie menopauzy.

Problem osteoporozy u pacjentek w okresie pomenopauzalnym

Amerykański Narodowy Instytut Zdrowia (*National Institutes of Health* – NIH) definiuje osteoporozę jako chorobę szkieletu, charakteryzującą się upośledzoną wytrzymałością kości, co powoduje zwiększone ryzyko wystąpienia złamania [5], a głównymi jej cechami jest zmniejszenie masy kostnej w połączeniu z zaburzeniem architektury tkanki kostnej.

Okolo 30. r.ż. osiągnięta jest szczytowa masa kostna, po czym dochodzi do powolnego zmniejszania gęstości tkanki kostnej (*bone mineral density* – BMD). Szybkość tej inwolucji po menopauzie szacuje się na 1,2–2% rocznie [6, 7]. Nasilenie utraty masy kostnej rozpoczyna się średnio 2–3 lata przed ostatnim krwawieniem miesięcznym. Wtedy też dochodzi do zmniejszenia syntezy estrogenów,

co jest uważane za jeden z najważniejszych elementów złożonej patogenezы osteoporozy. Hipostrogenizm powoduje bowiem wzmożenie destrukcyjnej aktywności osteoklastów oraz hamuje czynność osteoblastów [8].

Schorzenie charakteryzuje się długoletnim przebiegiem bezobjawowym. Pierwszą oznaką jest najczęściej złamanie, określane jako osteoporotyczne lub niskoenergetyczne, powstające w następstwie stosunkowo lekkiego urazu, który u osoby zdrowej nie spowodowałby przerwania ciągłości kości [7]. Ryzyko wystąpienia złamania bliższego odcinka kości udowej, kręgosłupa oraz nadgarstka w związku z obecnością zmian osteoporotycznych u kobiet w wieku menopauzalnym szacuje się na ok. 40% [7, 9]. Ponieważ proces gojenia się kości, zwłaszcza u osób starszych, jest złożony i długotrwały, złamania w przebiegu osteoporozy pomenopauzalnej są nie tylko najczęstszą przyczyną niepełnosprawności, ale także w wyniku powikłań mogą doprowadzić do śmierci pacjentki. Ryzyko zgonu w ciągu pierwszego roku po złamaniu w obrębie stawu biodrowego jest nawet o 25% większe niż w populacji ogólnej [6]. Pomimo postępu w zakresie ortopedycznych metod zaopatrywania złamań, często dochodzi także do przemieszczenia w kruchej strukturze osteoporotycznej kości stabilizatorów w postaci wkrętów lub gwoździ. Metalowa głowa endoprotezy w leczeniu złamań szyjki kości udowej może także z czasem zagłębiać się w strukturę panewki stawowej, powodując bolesność biodra, a w dalszej perspektywie – konieczność reoperacji [10]. Zatem, pomimo coraz doskonalszych metod leczenia operacyjnego, złamania w przebiegu osteoporozy pozostają poważnym problemem medycznym, socjalnym, a także ekonomicznym. Przewiduje się, że z powodu zwiększenia przeciętnej długości życia i postępującego starzenia się społeczeństw – zwłaszcza krajów wysoko rozwiniętych – odsetek osób dotkniętych osteoporozą i jej konsekwencjami w postaci złamań będzie coraz wyższy. Należy więc poszukiwać nowych, skutecznych i trwałych metod terapii, które spowodują poprawę rokowania i jakości życia.

Komórki macierzyste w leczeniu osteoporozy

Komórki macierzyste (*stem cells* – SCs) ze względu na ich zdolność do samoodnowy oraz ogromny poten-

cjał proliferacyjny, który umożliwia im różnicowanie się w wyspecjalizowane komórki różnych tkanek i narządów, stały się przedmiotem badań licznych grup naukowców na całym świecie [11], niosąc nadzieję na poprawę rokowania i optymalizację metod terapii wielu jednostek chorobowych, w tym schorzeń dotyczących układu kostnego.

Ponieważ rozwój osteoporozy jest związany z defektem samoodnawiania się progenitorów mezenchymalnych, bezpośrednie podanie komórek macierzystych do uszkodzonej tkanki może wspomagać procesy naprawy kości i chrząstki.

Na szczególną uwagę zasługują mezenchymalne komórki macierzyste (*mesenchymal stem cells* – MSCs). Stanowią one potencjalne źródło komórek progenitorowych osteoblastów, chondroblastów, adipocytów, mięśni szkieletowych i gładkich, a nawet kardiomiocytów [11, 12].

Model zwierzęcy

Terapia komórkowa ma ogromny wpływ na gospodarkę kostną [13, 14]. Przeprowadzono badania eksperymentalne na modelach mysich, które wykazały zależną od wieku inhibicję powstawania osteoklastów i osteoblastów. U starszych myszy stężenie interleukiny 11 (IL-11), która reguluje prze-modelowanie kości, było zmniejszone, co skutkuje zwolnieniem procesu różnicowania się osteoblastów. Ponadto zmniejszone było również stężenie IL-6, która w prawidłowych warunkach produkowana jest przez osteoblasty, a także reguluje powstawanie osteoklastów. Analogicznie do wyników uzyskanych w innych chorobach, badacze oczekiwali, że transplantacja MSCs pochodzenia szpikowego (*bone marrow-derived mesenchymal stem cells* – BMSCs) przyczyni się do odtworzenia tkanki kostnej. Dożylnie podanie okazało się jednak nieskuteczne. Pozytywne rezultaty przyniósł dopiero allogeniczny przeszczep BMSCs bezpośrednio do jamy szpikowej mysich modeli eksperymentalnych. Dokonano porównania badanych myszy z myszami wzorcowymi odpowiadającymi sobie pod względem wiekowym. Zauważono, że miejscowa transplantacja prowadzi do zwiększenia gęstości kości, zmniejszenia resorpcji kości i częściowej poprawy mechanizmów regulatorowych gospodarki kostnej [13, 14]. Z uwagi na pozytywne rezultaty uzyskane w modelach doświadczalnych, prowadzone są obecnie badania z wykorzystaniem ludzkich MSCs w celu prowadzenia terapii osób cierpiących na osteoporozę.

Źródła ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych

Dowiedziano, że ludzkie MSCs pochodzące ze szpiku kostnego lub okostnej są zdolne do tworzenia

w warunkach *in vivo* tkanki osteogennej [11], natomiast MSCs pochodzące z tkanki tłuszczowej (*adipose-derived mesenchymal stem cells* – ADSCs) okazały się nieco mniej wydajnym źródłem [15]. Starzenie się organizmu wywiera jednak mniejszy wpływ na ADSCs niż na BMSCs. Chen i wsp. [16] porównali czas podwojenia BMSCs i ADSCs w hodowli w zależności od wieku pacjentów, od których pobrano komórki. Czas podwojenia ADSCs zarówno wśród młodszych pacjentów, jak i starszych chorych na osteoporozę wyniósł mniej niż 70 godzin, natomiast w przypadku BMSCs wzrastał wraz z liczbą pasaży. Po stymulacji w kierunku indukcji osteogenezy stopień mineralizacji ADSCs w grupie osób starszych był zbliżony do wyników uzyskanych wśród młodszych pacjentów. Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia szpikowego starszych osób cechowała natomiast mniejsza ekspresja genów odpowiedzialnych za osteogenezę. Ekspresja genu *p21* i aktywność β -galaktozydazy, związanej z procesem starzenia, były mniejsze w ADSCs w porównaniu z BMSCs [16]. Dane te świadczą o większym potencjale proliferacyjnym i różnicującym ADSCs w porównaniu z BMSCs u starszych pacjentów. Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej pacjentów chorych na osteoporozę mogą zatem stać się wkrótce bardzo efektywnym źródłem pozyskiwania osteoblastów w celu leczenia powikłań osteoporozy, a nawet jej profilaktyki. Wyeliminowany zostałby problem ewentualnego odrzucenia przeszczepu allogenicznego, gdyż ADSCs pochodziłyby od pacjenta, który w danym momencie potrzebuje terapii komórkowej.

Uzyskane dotychczas wyniki badań pozwalają stwierdzić, że MSCs krwi pępowinowej również mogą mieć zastosowanie w terapii wielu chorób dotyczących układu kostnego, m.in. osteoporozy czy wrodzonej łamliwości kości (*osteogenesis imperfecta*). W praktyce klinicznej są podejmowane próby wykorzystywania MSCs w leczeniu wrodzonej łamliwości kości oraz skomplikowanych urazów, polegające na autologicznym przeszczepianiu MSCs, które przyspieszają odtwarzanie tkanki kostnej lub chrzęstnej [17, 18]. Przeszczepiano już BMSCs od rodzeństwa u dzieci z wrodzoną łamliwością kości. Poprawa wskaźników klinicznych pozwala sugerować, że pochodzące ze szpiku kostnego MSCs czynnie uczestniczą w naprawie tkanki kostnej i chrzęstnej [19, 20].

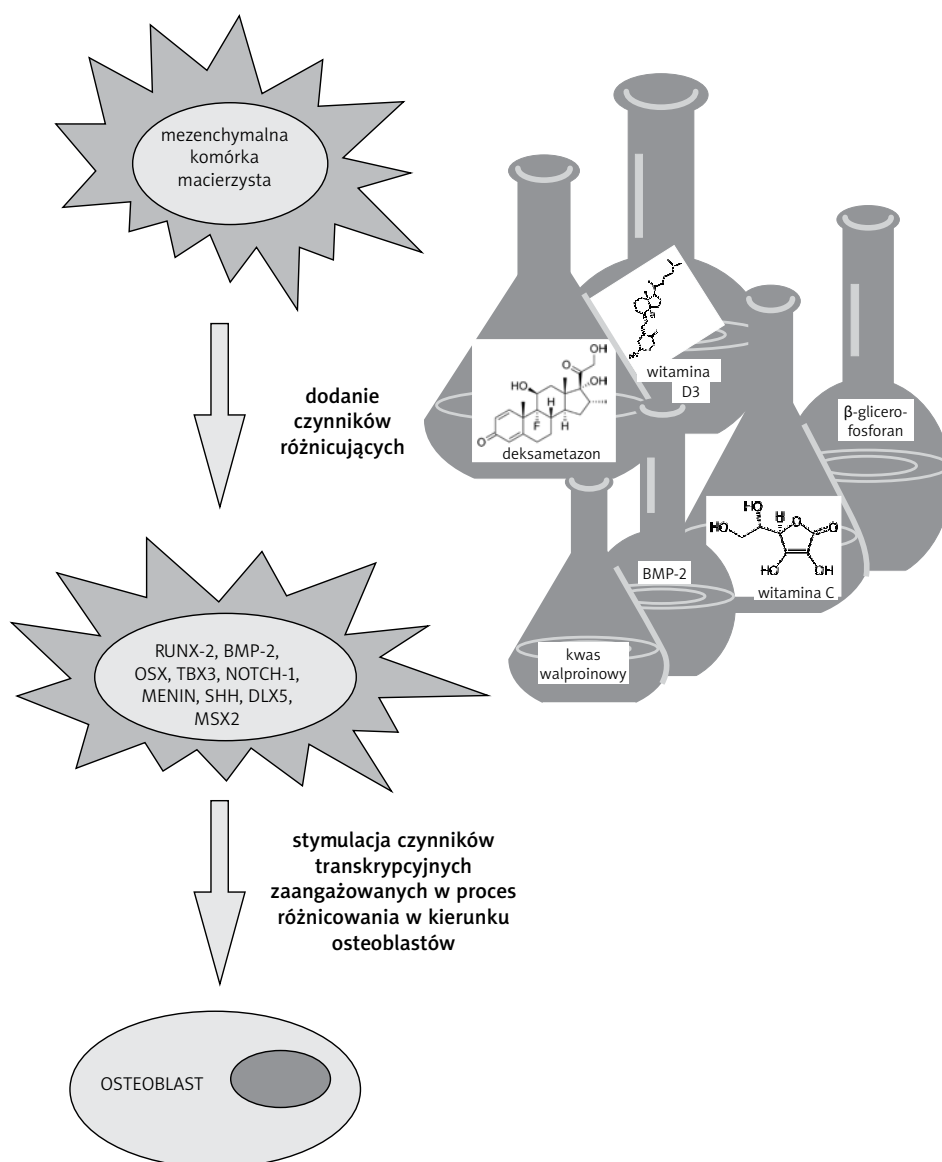
Hodowla i różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w kierunku osteoblastów

Prowadzenie hodowli MSCs w warunkach *in vitro* w celu późniejszego podania progenitorów osteogennych do miejsca złamania wymaga obecności szeregu swoistych czynników wzrostu lub związków chemicznych o właściwościach różnicujących [12]. Rycina 1. przedsta-

wia substancje, które należy dodać do pożywki hodowlanej (witamina D₃, witamina C, deksametazon, BMP-2, β-glicerofosforan, kwas walproinowy) w celu uzyskania osteoblastów, oraz specyficzne czynniki transkrypcyjne ulegające ekspresji w toku różnicowania uruchamiane podczas powstawania osteoblastów [21, 22].

Różnicowanie MSCs w kierunku poszczególnych linii komórkowych jest procesem podlegającym kontroli, m.in. przez białka morfogenetyczne kości (*bone morphogenetic proteins* – BMPs); BMP-2 i BMP-7 zostały poddane badaniom klinicznym i uzyskały pozytywną opinię w celu prowadzenia terapii trudnych do

leczenia złamań kości [22]; BMP-9 jest jednym z mniej poznanych BMPs, jednak najnowsze doniesienia wskazują na jego rolę w indukcji różnicowania MSCs w kierunku osteoblastów. Ekspresja BMP-9 w MSCs zwiększa ilość markerów osteogenezy i wpływa na formowanie się beleczek kostnych oraz macierzy tkanki kostnej [23]. Ponadto BMP-9 wykazuje działanie synergistyczne w kościotworzeniu z takimi szlakami przekazywania komórkowego, jak: Wnt/β-katenina, insulinopodobny czynnik wzrostu (*insulin-like growth factor* – IGF) i szlak retinoidowy [23]. Dzięki swojej silnej aktywności różnicującej wkrótce BMP-9



Ryc. 1. Schemat różnicowania *in vitro* mezenchymalnych komórek macierzystych w kierunku osteoblastów z wyszczególnieniem substancji różnicujących dodawanych

może się stać najważniejszym czynnikiem przyspieszającym namnażanie osteoblastów w osteoporotycznych kościach.

Mezenchymalne komórki macierzyste cechują się dodatkowo ekspresją receptorów estrogenowych α i β , a także receptora androgenowego [24]. 17β -estradiol, fitoestrogen genisteina, testosteron oraz dihydrotestosteron efektywnie przeciwdziałają adipogenezie w MSCs. Właściwości takie wykazano w MSCs stymulowanych do różnicowania w kierunku adipocytów. W komórkach tych oceniono marker świadczący o adipogenności – receptory aktywowane przez proliferatory peroksyosomów gamma (*peroxisome proliferator-activated receptors gamma* – PPAR- γ) oraz odsetek komórek tłuszczowych. Ponadto, gdy MSCs stymulowano do różnicowania w kierunku osteoblastów, wszystkie wymienione hormony powodowały zwiększenie ekspresji osteokalcyny (markera osteogenezy) i zmniejszały liczbę komórek tłuszczowych w hodowli. Dane te świadczą o korzystnym efekcie, jaki można uzyskać, dodając do MSCs, różnicujących się w kierunku osteoblastów estrogeny, a także łatwiejsze do pozyskania roślinne fitoestrogeny. Dzięki takiej kombinacji można szybciej uzyskać większą liczbę komórek kościotwórczych, redukując liczbę adipocytów.

Podsumowanie

Częste występowanie złamań osteoporotycznych okresu pomenopauzalnego oraz konsekwencje społeczne i ekonomiczne niepowodzeń w ich leczeniu [25] każą poszukiwać innych niż tylko chirurgiczno-ortopedyczne sposobów naprawy kośćca. Odkrycie potencjału osteogenego MSCs i liczne źródła, z których można te komórki pozyskać, niosą nadzieję na poprawę rokowania oraz jakości życia pacjentek. Szczególnie ważna jest obecność receptorów estrogenowych na MSCs, dzięki czemu, poprzez dodanie fitoestrogenów, można zwiększyć efektywność hodowli komórkowych. Możliwość uzyskania MSCs z tkanki tłuszczowej i ich relatywnie wysoki potencjał proliferacyjny, niezależny od wieku pacjenta, pozwala na kliniczne zastosowanie autologicznych MSCs w celu leczenia nawet zaawansowanych zmian osteoporotycznych.

Istnieje wiele doniesień potwierdzających, iż miejscowe podanie MSCs jest efektywną, bezpieczną i trwałą metodą, zapewniającą regenerację i przyspieszającą zrost złamań kości w różnych jednostkach klinicznych. Wydaje się, że mimo wysokich kosztów hodowli komórkowych, w ciągu najbliższych lat problem trudnych do leczenia powikłań osteoporozy może być zredukowany.

Piśmiennictwo

1. Problemy kliniczne okresu okołomenopauzalnego. Wytyczne The North American Menopause Society. *Med Prakt* 2002; 4: 146-55.
2. Hunter M. Mid-life menopause: psychological and social meanings. *Premature menopause. A multidisciplinary approach*. Whurr Publishers. London 2000; 37-53.
3. Bodera P, Poznański S, Dobrzański P. Menopauza – fizjologiczny okres w życiu kobiety. *Przew Lek* 2005; 5: 74-7.
4. Gajos A. Farmakoterapia a menopauza. *Świat Farm* 2010; 5: 22-3.
5. Suzin J, Szubert M, Kowalczyk-Amico K. Osteoporoza – częsty problem kobiety po menopauzie. *Przegl Menopauz* 2009; 6: 320-3.
6. Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 2010; 17: 25-54.
7. Tkaczuk-Włach J, Sobstyl M, Jakiel G. Osteoporoza – obraz kliniczny, czynniki ryzyka i diagnostyka. *Przegl Menopauz* 2010; 2: 113-7.
8. Daniels CE. Estrogen therapy for osteoporosis prevention in postmenopausal women. *Pharmacy Update – NIH* 2001; March/April.
9. Heaney RP, Recker RR, Ryan RA. Urinary calcium in perimenopausal women: normative values. *Osteoporos Int* 1999; 9: 13-8.
10. Synder M, Bara T. Znaczenie osteoporozy w praktyce ortopedycznej. *Przegl Menopauz* 2003; 2: 62-7.
11. Kawiak J. Komórki macierzyste organizmu dorosłego w biologii i medycynie. *Postępy Biol Komórki* 2009; 36: 99-110.
12. Bajek A, Olkowska J, Drewa T. Mezenchymalne komórki macierzyste narzędziem terapeutycznym w regeneracji tkanek i narządów. *Postępy Hig Med Dośw* 2011; 65: 124-132.
13. Ichioka N, Inaba M, Kushida T, et al. Prevention of senile osteoporosis in SAMP6 mice by intrabone marrow injection of allogeneic bone marrow cells. *Stem Cells* 2002; 20: 542-51.
14. Jethva R, Otsuru S, Dominici M, Horwitz EM. Cell therapy for disorders of bone. *Cytotherapy* 2009; 11: 3-17.
15. Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, et al. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int* 2008; 82: 238-47.
16. Chen HT, Lee MJ, Chen CH, et al. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *J Cell Mol Med* 2011 (Epub ahead of print).
17. Bieback K, Klüter H. Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr Stem Cell Res Ther* 2007; 2: 310-23.
18. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 2007; 53: 121-7.
19. Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 2001; 97: 1227-31.
20. Anselme K, Broux O, Noel B, et al. In vitro control of human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2002; 8: 941-53.
21. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, et al. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1115-22.
22. Olkowska-Truchanowicz J. Różnicowanie komórek prekursorowych izolowanych z tkanki tłuszczowej – nowe możliwości dla inżynierii tkankowej i terapii komórkowej. *Postępy Biol Komórki* 2009; 36: 217-31.
23. Luther G, Wagner ER, Zhu G, et al. BMP-9 induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: molecular mechanism and therapeutic potential. *Curr Gene Ther* 2011; 11: 229-40.
24. Benvenuti S, Cellai I, Luciani P, et al. Androgens and estrogens prevent rosiglitazone-induced adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *J Endocrinol Invest* 2011 (Epub ahead of print).
25. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002; 359: 1761-7.