UNIVERZITET U KRAGUJEVCU

FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

MASTER RAD

Primena mezenhimalnih matičnih ćelija i njihovih derivata u terapiji neurodegenerativnih bolesti sa posebnim fokusom na Alchajmerovu bolest

Mentor:

Prof. dr Biljana Ljujić

Student:

Aleksandra Vujović 14/2024

Kragujevac, 2026

Sažetak

Neurodegenerativne bolesti su jedan od vodećih uzroka invaliditeta i zavisnosti starije populacije, utičući ne samo na pacijente, već i na porodice i zdravstvene sisteme u celom svetu. One su progresivne, složene i trenutno neizlečive, a dostupne terapije uglavnom imaju za cilj samo ublažavanje samih simptoma, što predstavlja veliki nedostatak. Zbog toga je potraga za efikasnom terapijom, koja bi usporila ili zaustavila neurodegeneraciju, postala jedan od najvažnijih zadataka savremene medicine.

Mezenhimalne matične ćelije (MSCs) i njihovi derivati (egzosomi, sekretom i kondicionirani medijum) se prepoznaju kao obećavajući bioterapeutski pristup, zahvaljujući sposobnosti da utiču na neuroinflamaciju, oksidativni stres i apoptozu neurona, time što će umanjiti navedene patološke procese, kao i da podstaknu sinaptičku plastičnost i regeneraciju nervnog tkiva. Cilj ovog rada bio je da se sistematski prikaže i analizira postojeća literatura o primeni MSCs i njihovih derivata u terapiji neurodegenerativnih bolesti, sa posebnim fokusom na Alchajmerovu bolest i njihovoj potencijalnoj terapijskoj efikasnosti.

Analiza dobijenih rezultata iz prekliničkih studija je pokazala značajna poboljšanja morfoloških, molekularnih i funkcionalnih ishoda, dok rane kliničke studije potvrđuju visoku bezbednost i izražen potencijal stabilizacije kognitivnih funkcija. Derivati MSCs u mnogim aspektima repliciraju, a ponekad i prevazilaze efekat ćelijske terapije, time ukazujući važnost parakrinih mehanizama. Ipak, uspešnost kliničke primene zavisi od standardizacije protokola, individualizacije terapije i dugoročnog praćenja, ali ujedno može pružiti obećavajuće rezultate.

Zaključuje se da MSCs i njihovi derivati poseduju veliki potencijal da unaprede lečenje neurodegenerativnih bolesti, nudeći pristup koji za cilj ima regeneraciju nervnog sistema, a ne fokusirajući se usko samo na simptmacko lečenje.

Ključne reči: mezenhimalne matične ćelije, egzosomi, neurodegenerativne bolesti, Alchajmerova bolest, regenerativna medicina

Abstract

Neurodegenerative diseases are one of the leading causes of disability and dependency in the elderly population, affecting not only patients but also families and healthcare systems worldwide. They are progressive, complex, and currently incurable, while available therapies are mainly aimed only at alleviating symptoms, which represents a major limitation. Therefore, the search for an effective therapy that would slow down or halt neurodegeneration has become one of the most important tasks of modern medicine.

Mesenchymal stem cells (MSCs) and their derivatives (exosomes, secretome, and conditioned medium) are recognized as a promising biotherapeutic approach, thanks to their ability to influence neuroinflammation, oxidative stress, and neuronal apoptosis by reducing these pathological processes, as well as to promote synaptic plasticity and regeneration of nervous tissue. The aim of this paper was to systematically present and analyze the existing literature on the application of MSCs and their derivatives in the treatment of neurodegenerative diseases, with a particular focus on Alzheimer's disease and their potential therapeutic efficacy.

The analysis of results obtained from preclinical studies showed significant improvements in morphological, molecular, and functional outcomes, while early clinical studies confirm high safety and a pronounced potential for stabilization of cognitive functions. MSC derivatives in many aspects replicate, and sometimes even surpass, the effects of cellular therapy, thereby indicating the importance of paracrine mechanisms. However, the success of clinical application depends on protocol standardization, therapy individualization, and long-term follow-up, but at the same time it can provide promising results.

It is concluded that MSCs and their derivatives possess great potential to improve the treatment of neurodegenerative diseases, offering an approach aimed at regeneration of the nervous system rather than focusing narrowly only on symptomatic treatment.

Keywords: mesenchymal stem cells, exosomes, neurodegenerative diseases, Alzheimer's disease, regenerative medicine

Sadržaj

Sažetak 2
Abstract 3
1. UVOD 6
1.1. Neurodegenerativne bolesti 6
1.2. Mehanizmi nastanka neurodegenerativnih bolesti 7
1.2.1. Mehanizmi nastanka Alchajmerove bolesti 8
1.2.2. Mehanizmi nastanka Parkinsonve bolesti 13
1.2.3. Mehanizmi nastanka amiotrofne lateralne skleroze 14
1.2.4. Mehanizmi nastanka Huntingtonove bolesti 15
1.2.5. Mehnizmi nastanka multiple skleroze 16
1.3. Ograničenja trenutnih terapijskih strategija u lečenju neurodegenerativnih bolesti 17
2. Terapijski potencijal MSCs u lečenju neurodegenerativnih bolesti 18
2.1. MSCs i njihove biološke karakteristike 18
2.2. Uticaj MSCs na mehanizme nastanka neurodegenerativnih oboljenja 20
2.3. Prednosti primene MSCs u lečenju neurodegenerativnih oboljenja 25
2.4. Ograničenja i izazovi primene MSCs u neurodegenerativnim oboljenjima 27
3. Derivati MSCs - osnovne karakteristike 30
3.1. Sekretom MSCs, ekstracelularne vezikule i egzosomi i kondicionirani medijum 31
3.2. Mehanizmi delovanja MSCs derivata na patološke mehanizme koji se nalaze u osnovi neurodegenerativnih oboljenja 33
3.3. Prednosti derivata MSCs u odnosu na ćelijsku terapiju MSCs 40
4. Metodologija 43
4.1. Metodološki okvir 43
4.2. Pretraživačka strategija 43
4.3. Kriterijumi uključivanja i isključivanja 44
4.4. Sistematizacija i analiza podataka 44
4.5. Etički aspekti i značaj za kliničku primenu 45
4.6. Ograničenja metodološkog pristupa 45
5. Pretkliničke studije 47
5.1. Studije na životnjskim modelima – MSCs terapija 47
5.1.1. Studije na životnjskim modelima AB - MSCs terapija 48
5.1.2. Studije na životinjskim modelima ostalih neurodegenerativnih oboljenja - MSCs terapija 51
5.2. Studije na životinjskim modelima - terapija MSCs derivatima 59
5.2.1. Studije na životinjskim modelima AB - terapija MSCs derivatima 60
5.2.2. Studije na životinjskim modelima ostalih neurodegenerativnih oboljenja -terapija MSCs derivatima 62
6. Kliničke studije 67

6.1. Kliničke studije primene MSCs kod AB 67
6.2. Kliničke studije primene MSCs kod ostalih neurodegenerativnih oboljenja 70
6.3. Kliničke studije primene MSCs derivata kod AB 72
6.4. Kliničke studije primene derivata MSCs kod ostalih neurodegenerativnih oboljenja 74
7. Diskusija 76
7.1. Kritička analiza rezultata 76
7.2. Poređenje nalaza pregleda literature sa postojećim istraživanjima i translacioni kontekst 78
7.3. Ograničenja studija i rada 81
8. Zaključak 83
8.1. Sažetak najvažnijih nalaza 83
8.2. Naučni i stručni doprinos rada 85
8.3. Ograničenja rada i preporuke za buduća istraživanja 86
9. LITERATURA 87

1. UVOD

1.1. Neurodegenerativne bolesti

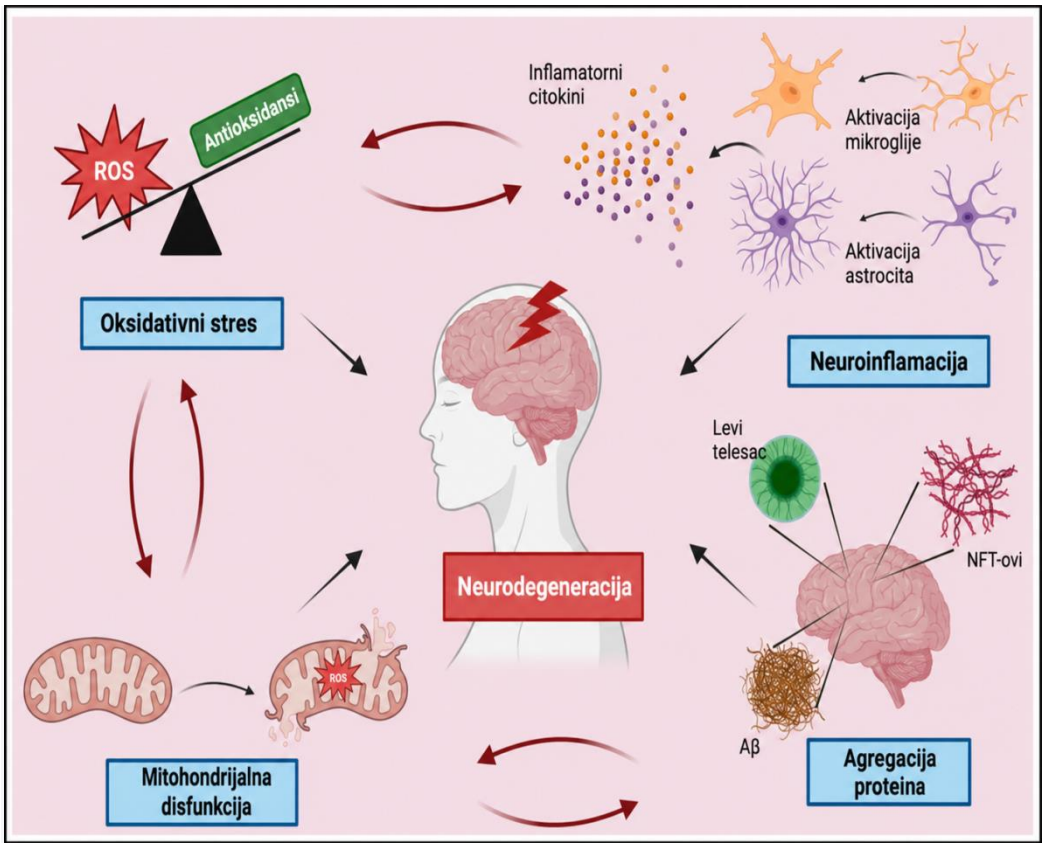
Neurodegenerativne bolesti predstavljaju heterogenu grupu doživotnih i progresivnih oboljenja nervnog sistema, koje su praćene postepenim gubitkom strukture i funkcije neurona u različitim regionima mozga i kičmene moždine (1). Propadanje neurona tokom vremena dovodi do poremećaja u regulaciji osnovnih životnih funkcija, kao i kognitivnih, motoričkih, senzornih i emocionalnih sposobnosti organizma (2). Iako se klinička slika i brzina napredovanja razlikuju među pojedinim bolestima, zajedničko im je trajno oštećenje strukturne i funkcionalne celovitosti nervnog sistema, koje se vremenom progresivno pogoršava (3).

Neurodegenerativne bolesti najčešće se javljaju kod osoba starijeg životnog doba, usled čega se povezuju sa procesima starenja. Uprkos tome, one se mogu javiti i kod mladih osoba, pri čemu mogu značajno da remete radnu sposobnost, socijalno funkcionisanje i kvalitet života obolelih, kao i njihovih porodica (3,4). S obzirom na to da su bolesti ovog tipa najčešće hroničnog toka i zahtevaju dugotrajno medicinsko lečenje i negu, koja se u velikoj meri sprovodi u kućnim uslovima, one predstavljaju značajan zdravstveni i društveno-ekonomski izazov za savremene zdravstvene sisteme, ali i za samo stanovništvo(4,5).

Prema najnovijim podacima, prevalenca i mortalitet neurodegenerativnih bolesti kontinuirano rastu, prvenstveno usled globalnog povećanja životnog veka stanovništva (5). Zbog toga su jednan od vodećih uzroka invaliditeta i smrti u starijoj populaciji, a predviđanja su da će u narednim decenijama biti još češći zdravstveni problem (5). Uprkos istraživanjimakoja su u velikoj meri sprovođena i sprovode se iz oblasti neurobiologije u cilju razvoja terapija, većina dostupnih tretmana je simptomatska i ne može trajno zaustaviti progresiju bolesti, niti otkloniti primarni uzrok istih (2,3).Iz već navedenih razloga, neurodegenerativne bolesti se nalaze u fokusu savremenih naučnih istraživanja, sa ciljem boljeg razumevanja njihovih osnovnih karakteristika i pronalaženja efikasnih terapija, koje bi pospešile očuvanje nervnog tkiva i samim tim za posledično bi dovelo do poboljšanja prognoze obolelih (3,4). Napredne terapijske strategije zasnovane na regenerativnoj medicini, sa posebnim fokusom na matične ćelije i njihove derivate, koje nude mogućnost obnove izgubljenih neuronskih funkcija i usporavanja neurodegenerativnih procesa, trenutno privlače pažnju naučnicima širom sveta. Najčešće i najistraživanije bolesti u ovoj grupi su Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza, Huntingtonova bolest i multipla skleroza (4).

1.2. Mehanizmi nastanka neurodegenerativnih bolesti

Neurodegeneracija je vodeća patofiziološka promena koja uzrokuje većinu poremećaja povezanih sa mozgom što zapravo predstavlja progresivni gubitak neurona, odnosno njihovih struktura ili funkcije. Sem već pomenutog progresivnog gubitka neurona, neurodegeneraciju karakteriše progresivan gubitak sinapsi, neuronske mreže i taloženje fiziohemijskih izmenjenih oblika proteina u mozgu (6). U nastavku će detaljnije biti opisani mehanizmi nastanka, već pomenutih neurodegenerativnih oboljenja.



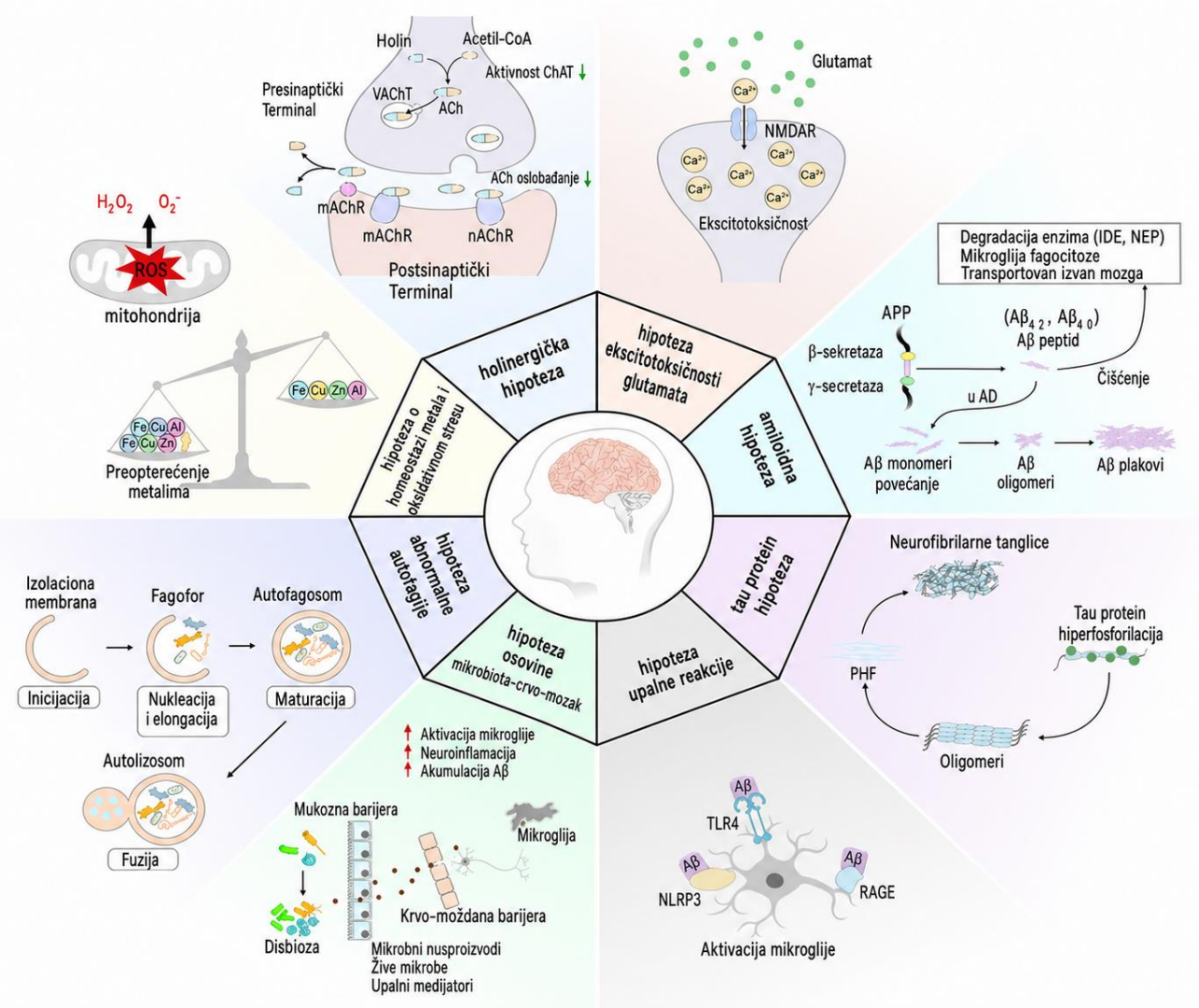
Slika 1. Šematski prikaz ključnih mehanizama uključenih u nastanak neurodegenerativnih oboljenja.Modifikovano prema: Angeloni et al. *Mechanisms underlying neurodegenerative disorders and potential neuroprotective activity of agrifood by-products*. Antioxidants (Basel) (7).

U osnovi neurodegenrativnih oboljenja se nalaze brojni mehanizmi: oksidativni stres, mitohondrijalna disfunkcija, neuroinflamacija i agregacija patoloških proteina (amiloid-beta peptidi, tau protein, alfa-sinuklein protein, međusobno povezani procesi koji doprinose progresivnom oštećenju i gubitku neurona, što u krajnjem ishodu dovodi do neurodegeneracije (Slika 1.).

1.2.1. Mehanizmi nastanka Alchajmerove bolesti

Alchajmerova bolest (AB) predstavlja najčešći uzrok demencije i progresivnog kognitivnog propadanja u starijoj životnoj dobi (8,9). Karakteriše je progresivno i trajno oštećenje neurona i sinaptičkih veza, prvenstveno u hipokampusu i korteksu, što posledično dovodi do poremećaja pamćenja, učenja, orijentacije, izvršnih funkcija i ponašanja (8,9). Klinički, karakteriše je podmukli početak, najčešće u vidu suptilnih smetnji pamćenja, da bi vremenom napredovala od umerene do teške demencije, što prati gubitak samostalnosti i potpune funkcionalne zavisnosti obolelog lica. Na moždanom nivou, patološka slika obuhvata difuznu kortikalnu i hipokampalnu atrofiju, proširenje moždanih komora i izraženi gubitak neurona i sinapsi (8,9).

Patogeneza AB se opisuje kroz dve ključnepatohistološke karakteristike: ekstracelularni amiloidni plakovi, koji čine depoziti amiloid-beta peptida, i intracelularna neurofibrilarna klupka, sastavljena od hiperfosforilisanog tau proteina, što predstavlja tradicionalna objašnjenja(8,9,10).Međutim, savremeni koncept stavlja akcenat da AB nije posledica izolovanog “amiloidnog” ili “tau” defekta, već složenog, dinamičkog i kompleksnog poremećaja u kome su međusobno povezana amiloidna kaskada, tau patologija, hronična neuroinflamacija, oksidativni stres, mitohondrijalna disfunkcija, poremećaj proteostaze, disfunkcija krvno–moždane barijere i promene u moždanom mikrookruženju (8,9,10).



Slika 2. Mehanizmi patogeneze AB. Modifikovano prema: Zhang et al. *Recent advances in Alzheimer's disease: mechanisms, clinical trials and new drug development strategies*. Signal Transduction and Targeted Therapy (11).

Centralni patofiziološki mehanizmi u razvoju AB su: akumulacija amiloidnih plakova i tau patologija, hronična nuroinflamacija, oksidativni stres i mitohondrijalna disfunkcija, poremećaj proteostaze, oštećenje krvno-moždane barijere i promene nastale u moždanom mikrookruženju (Slika 2.).

Osnova patofizioloških procesa AB dugo jeamiloidna kaskada, prema kojoj nastajedisbalansom između produkcije i eliminacijeamiloid-betapeptide(Aβ), koji je prethodno nastao proteolitičkom obradom prekursorskog proteina amiloida (APP)(8,9,10,12).U normalnim fiziološkim uslovima, APP se razgrađuje ne-amiloidogeni putem, dok u patološkim uslovima dominantan je amiloidogeni put, gde β- i γ-sekretaza stvaraju Aβ peptide različite dužine, od kojih je Aβ42 je posebno sklon agregaciji(8,9,10).Smatra se da nakupljanje Aβ, pogotovo u obliku rastvorljivih oligomera je izuzetno toksično za sinapse, jer ovi oligomeri remete sinaptičku transmisiju, smanjuju broj dendritskih

bodlji,menjaju sastav postsinaptičkih receptora, narušavaju homeostazu kalcijuma, pojačavaju glutamatnu toksičnost i podstiču produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta. Vremenom, oligomeri formiraju veće fibrile i plakove, ali bez obzira na to, rastvorljive vrste Aβ danas se smatraju glavnim uzročnicima neurotoksičnosti i početak sinaptičkih poremećaja (8,9,10,12). Smatra se da je upravo gubitak sinapsi bolji prediktor kognitivnog pada nego broj plakova ili tau agregata. (10)

Paralelno sa amiloidnom kaskadom odvija se i tau patologija. Tau je mikrotubulski–asocirani protein, koji u normalnim fiziološkim uslovima stabilizuje mikrotubule i omogućava normalan aksonalni transport, dok u slučaju AB dolazi do njegovog prekomernog i abnormalnog fosforilisanja, delom je uzrokovano uticajem signalnih puteva aktiviranih Aβ, oksidativnog stresa i inflamatornih medijatora(8,9).Hiperfosforilisani tau protein gubi sposobnost vezivanja za mikrotubule, zatim se odvaja od njih, skuplja se u parno–helikalne filamente i na kraju formira neurofibrilarna klupka u neuronskoj citoplazmi. Ovaj proces za posledicu ima destabilizaciju mikrotubula, prekide aksonalnog transporta nutritijenata i organela, akumulaciju toksičnih supstanci u neuronu i, konačno, do njegove disfunkcije i smrti. Kako se tau patološke promene šire u mozgu, tako se pogoršavaju i kognitivne funkcije, što potvrđuje važnost tau-a u ispoljavanju AB (8,9).

U AB ekscitotoksičnost je usko povezana sa amiloidnom i tau patologijom, jer rastvorljivi Aβ oligomeri iniciraju pojačanu aktivaciju ekstrasinaptičkih NMDA receptora in a taj način narušavaju fiziološku regulaciju Ca^{2+}, čime se narušava sinaptička plastičnost i slabi dugotrajna potencijacija. Ovaj proces smatra se da se dešava među prvima u razvoju samog oboljenja, pre nego što dođe do masivnog propadanja neurona (8,9).

Iako su Aβ i tau najprepoznatljiviji uzroci nastanka AB, gubitak sinapsi i disorganizacija neuronskih mrežanajbolje pokazuju progresiju kognitivnog pogoršanja (8,9). Rastvorljivi Aβ oligomeri ometaju funkciju postsinaptičkih receptora (posebno NMDA i AMPA receptora), narušavaju ravnotežu između ekscitatornih i inhibitornih sinaptičkih veza što za posledicu ima slabljenje dugotrajne potencijacije, koja je osnovni mehanizam učenja i pamćenja(8,9).U isto vreme, patološki tau se pogrešno raspoređuje iz aksona u somu i dendrite, čime dodatno narušava funkciju sinapsi i utiče na gubitksinapsi. Posledica ovih procesa je progresivno narušavanje funkcionalnih mreža u asocijativnim kortikalnim regionima, što se manifestuje poremećajem složenih kognitivnih funkcija, pre nego što je uočen vidljivgubitak neurona (8,9).

Najnovija istraživanja pokazuju da hronična upala u mozgu (neuroinflamacija) ima veoma važan učinak u nastanku i napredovanju AB, što znači da ona nije samo posledica oštećenja, već jedan od glavnih pokretača čitavog procesa, kao i u većini drugih propratnih patofizioloških mehanizama koji prate starost (8).Za razliku od akutne inflamacije, koja ima zaštitnu ulogu, hroničan oblik je izuzetno

štetan, jer uzrokuje trajno oštećenje nervnog tkiva i formira mikrookruženje adekvatno za dalju neurodegeneraciju (8,9). U osnovi neuroinflamacije centralnu ulogu ima dugotrajna aktivacije mikroglije i astrocita, koja nastaje kao posledica prisustva patoloških proteina, oksidativnog stresa, mitohondrijalne disfunkcije i oštećenog nervnog tkiva(7,8,9). Inflamacija koja bi primarno trebala da ima zaštitnu ulogu, ona kada pređe u hronično stanje, kontinuirano luči prinflamatorne citokinine (TNF-α, IL-1β, IL-6), reaktivne kiseonične vrste i azot-monoksid što dovodi do pojačane ekscitotoksičnosti, mitohondrijalnog oštećenja, gubitka sinapsi i progresivne smrti neurona (8,9). Sve veme, mikroglija ostaje dominantno u M1, proinflamatornom fenotipu, dok astrociti pod dejstvom inflamatornih signala prelaze u toksični A1 fenotip, čime se stvara začarani krug neuroinflamacije i neurodegeneracije (13). Genetski faktori rizika, poput određenih varijanti gena TREM2 i APOE, mogu učiniti mikrogliju još osetljivijom na ove promene i pojačavju upalu. Na ovaj način se formira začarani krug, odnosno, što je upala jača, to je više oštećenih neurona, a što je više oštećenja, upala se dalje pojačava (8).

U mozgu se menja i samo mikrookruženje u kojem neuroni žive i funkcionišu (10).Mikrookruženje centralnog nervnog sistema poseduje uslove u kojima neuron i glijalne ćelije funkcionišu, kao i balans citokinina i hemokina. Elementi mikrookruženja su i oksidativno stanje, trofička podrška, sastav ekstracelularnog matriksa (engl. *Extracellular matrix,*ECM), integritet krvno–moždane barijere i međusobna komunikacija nervnih i glijalnih ćelija (6,9,10).Umesto uravnoteženog stanja, ono postaje izrazito upalno i pod stresom, sa poremećenom komunikacijom između nervnih i glijalnih ćelija(10).Molekuli koji se u takvim uslovima oslobađaju mogu dodatno narušiti ćelijsku homeostazu i funkcionalnu aktivnost neurona, otežavajući njihovo normalno funkcionisanje. Posledično, smanjuje se efikasnost uklanjanja štetnih proteina, dok su procesi obnove i održavanja oštećenih neuronskih veza dodatno otežani. Na taj način, mikrookruženje koje u fiziološkim uslovima ima ključnu ulogu u održavanju zdravlja i funkcije neurona može postati faktor koji doprinosi njihovom oštećenju (10).

U AB, oksidativni stres i mitohondrijalna disfunkcija prestavljaju glavne uzročnike oštećenja neurona. Ovi patofiziološki mehanizmi su povezani sa akumulacijom Aβ peptida i patološkim promenama tau proteina, deluju tako što jedan pojačava drug i formiraju začarani krug. Iz svega ovoga proizilazi progresivan gubitak sinapsi i neurona, odnosno, kognitivno propadanje, karakteristično za ovu bolest (8,9,10).Aβ, pogotovo u obliku rastvorljivih oligomera, ima jak toksični uticaj na mitohondrije. Ovi oligomeri mogu direktno da se vežu za mitohondrijalne membrane i komponente elektron-transportnog lanca, posebno komplekse I i IV, što dovodi do poremećaja normalnog toka elektrona i povećanog, metaforički rečeno, curenja elektrona ka kiseoniku. Kao posledica toga, dolazi do pojačanog stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), uključujući superoksid i vodonik-peroksid, koji dprinosi oštećenju mitohondrijalnih lipida, proteina i DNK (8,9). Ovakva mitohondrijalna

oštećenja direktno smanjuju sposobnost neurona da proizvode ATP, čime se narušava energetska homeostaza ćelije. Paralelno sa ovim procesom, patološki tau protein pogršava mitohondrijalnu disfunkciju. Tau protein u normalnim uslovima ima ulogu da stabilizuje mikrotubule i omogućava efikasan aksonalni transport, uključujući transport mitohondrija od tela neurona ka sinapsama, gde je najveća energetska potreba. U AB, hiperfosforilisani tau gubi sposobnost vezivanja za mikrotubule,što dovodi do njihove destabilizacije i prekida transportnih puteva. Kao posledica toga, mitohondrije ne stižu do sinaptičkih završetaka, već ostaju zadržane u somi ili proksimalnim delovima aksona (8,9). Sinapse, koje imaju veliku energetsku potrebu, ostaju bez dovoljne količine ATP-a i dolazi do poremećaja sinaptičke transmisije i gubitka sinaptičke plastičnosti, što rezultira sinaptičkim propadnjem (9). Na sve ovo, dodatno opterećenje pretsavlja oskidativni stres, jer pojačava sve postojeće patofiziološke procese, kao što je povećanje produkcije ROS, koje i oštećuje mitohondriju i utiče i na dalju agregaciju Aβ i hiperfosforilaciju tau proteina. U isto vreme aktivira inflamatorne signalne puteve u neuronima i glijalnim ćelijama, što dodatno pogoršava mitohondrijalnu disfunkciju i energetski kolaps neurona (8,10).

AB je takođe praćena poremećajem sistema ili mehanizama, koji su zaduženi za "čistoću" ćelija, odnosno uklanjanje oštećenih i pogrešno savijenih proteina (8). U normalnim uslovima, neuroni koriste različite procese da eliminišu višak ili oštećene proteine, poput autofagije i ubiquitin–proteasomskog sistema, međutim, kod ovog oboljenja ovi mehanizmi više ne funkcionišu pravilno u korist same ćelije, pa se štetni proteini, uključujući Aβ i tau, nakupljaju i stvaraju dodatno opterećenje i stes za ćeliju. Inhibicija autofagije u Alchajmerovoj bolesti povezuje se sa hiperaktivacijom mTOR signalnog puta, koji inhibira autofagiju fosforilacijom ULK1 kompleksa. Na taj način se sprečava inicijacija formiranja autofagozoma, čime se smanjuje efikasnost uklanjanja patoloških agregata Aβ i tau proteina (8,9). Posledično dolazi do akumulacije oštećenih i abnormalnih ćelijskih komponenti i razvoja hroničnog ćelijskog stresa, što može dodatno doprineti disfunkciji i progresivnom propadanju neurona (8).

Poremećaji u radu krvno–moždane barijere (KMB) predstavljaju još jedan faktor koji doprinosi razvoju i nastanku AB. KMB u fiziološkim uslovima ima ulogu svojevrsne „zaštitne kapije" koja strogo reguliše prolazak supstanci između krvotoka i moždanog tkiva, kontrolišući šta može dospeti u mozak, ali i šta iz njega može preći u sistemsku cirkulaciju (8,9).

Kod AB, ova barijera je oštećena i propustljiva.Baza ovog patološkog mehanizma je hronična inflamacija, koja prouzrokuje aktivaciju NF-κB signalnog puta u endotelijalnim ćelijama i izazivač je povećane produkcije proinflamatornih citokinina i metaloproteinaza, pogotovo MMP-9 (8). Osnova ovog mehanizma se zasniva na destruktivnom delovanju MMP-9,koje se manifestuje razgradnjom proteina, koji formiranju tight-junction strukture, zbog čega dolazi do propustljivosti KMB i

omogućavajući ulazak perifernih imunskih ćelija i inflamatornih molekula u CNS, dok se istovremeno smanjuje iznošenjeAβiz moždanog tkiva (8,9). Uz to, promene na krvnim sudovima i smanjena moždana cirkulacija dodatno povećavaju oksidativni stres i upalu i na taj način, i vaskularni faktori doprinose razvoju i ubrzanju degenerativnih procesa u mozgu (8,9).

Danas je poznato da AB nije rezultat jednog poremećaja, već kombinacija više međusobno povezanih procesa, odnosno, nagomilavanja Aβ i tau-a, upale, oksidativnog stresa, oštećenja KMB i poremećenog uklanjanja proteina (8,9,10). Svi ovi procesi se međusobno pojačavaju i stvaraju začarani krug koji vodi do postepenog i progresivnog gubitka sinapsi i nervnih ćelija. Upravo ta složenost je razlog zbog kog mnoge terapije koje ciljaju samo na jedan mehanizam nisu dale očekivanepozitivne rezultate u lečenju bolesti i zbog toga danas naučnici teže ka strategijama koje bi istovremeno delovale na više ovih patoloških procesa, a potencijalno i na sva (8,9,10,12).

1.2.2. Mehanizmi nastanka Parkinsonove bolesti

Jedan od značajnih patoloških mehanizama koji se nalazi u osnovi Parkinsove bolesti (PB) je agregacija proteina. Proteini koji formiraju agregate supogrešno savijeni i nakupljani proteiniα-sinukleina u obliku oligomera i fibrila i taloži se u obliku Lewy-jevih tela. Ti agregati remete normalnu sinaptičku funkciju i oštećuju transport vezikula i mitohondrija duž aksona i direktno doprinose smrti dopaminergičnih neurona *Substantia nigra* (6,13).Sinaptička disfunkcija povezana je sa poremećajem dopaminergičke transmisije u nigrostrijatalnom sistemu. Dolazi do smanjenog oslobađanja dopamina, poremećaja u recikliranju sinaptičkih vezikula i disbalansa glutamatne signalizacije, što postepeno narušava funkciju motornih mreža pre same neuronske smrti (10,12).Dok u normalnim fiziološkim uslovimaα-sinuklein učestvuje u regulaciji sinaptičkog oslobađanja neurotransmitera (13).Metabolički i oksidativni stres sa mitohondrijalnom disfunkcijom kao drugi uzročnik započinje agregacijom α-sinukleina i poremećajima u ćelijskoj homeostazi koji doprinose oštećenju mitohondrija, smanjenju energetske produkcije, pojačanoj produkciji reaktivnih kiseoničnih formi i oksidativnoj šteti. Sve pomenuto povećava osetljivost neurona na stres i oštećenja (13). Oštećenja izazvana agregatima i oksidativnim stresom mogu izazvati preteranu aktivaciju glijalnih ćelija (mikroglija, astrociti), što dovodi do oslobađanja proinflamatornih citokina (TNF-α, IL-1β, IL-6) i dodatnih toksičnih supstanci (ROS), čime inflamacija pospešuje progresiju neurodegeneracije i taj proces se naziva glijalna/imunološka aktivacija i neuroinflamacija (13).U slučaju PB kao i kod AB formira se začarani krug, kada oštećeni neuroni šalju signale za “pomoć”, što dodatno stimuliše mikrogliju, ona formira agresivniji odgovor, čime okruženje biva još toksičnije, što posledično dovodi do povećane

smrtnosti motornih neurona (6,13).Disfunkcija KMB kod PB smatra se sekundarnim patološkim mehanizmom, kao i kod AB i povezana je sa hroničnom inflamacijom, aktivacijom NF-κB signalnog puta, povećanom produkcijom proinflamatornih citokina i aktivnošću MMP-9, što može doprineti narušavanju integriteta tight junction struktura i povećanoj propustljivosti KMB. Ovakve promene povezane su sa pojačanom neuroinflamacijom i povećanom osetljivošću neurona na toksične signale iz periferije, što značajno utiče na neurodegeneraciju (6,13). U PB oskidativni stres ima veliku bitnost u negativnom kontekstu, jer dopaminergični neuroni već funkcionišu pod velikim metaboličkim opterećenjem (13). Metabolizam dopamine, inače može da dovede do stvaranja ROS, a kada se uz to pridruži mitohondrijalna disfunkcija, znatno se povećava oksidativni stres. U isto vreme agregati α-sinukleina negativno utiču na normalan transport mitohondrija duž aksona, zbog čega mitohondrije ne stižu do aksona gde je najveća energetska potreba, jer se na mestu sinapsi proizvodi ATP i reguliše Ca^{2+}. Kod PB, dopaminergični neuroni *Substantia nigra* imaju ograničen kapacitet za vezivanje i uklanjanje viška Ca^{2+}, dok u isto vreme koriste Ca^{2+}-zavisne mehanizme za održavanje svoje spontane električne aktivnosti. Zbog ovih fizioloških osobina su jako osetljivi na poremećaje glutamatne signalizacije. Kada su prekomerno aktivirani NMDA receptori dolazi do hroničnog preopterećenja Ca^{2+} i narušavanja kalcijumske homoestaze, sve to dodatno prouzrokuje mitohondrijalnu disfunkciju i pojačanu produkciju ROS, čime se znatno ubrzava degeneracija neurona (13).Posledica svega ovoga je obično smrt neurona ili njegovi oštećenje, jer funkcija sinapsi slabi (6,13).Još jedna od negatvnih posledica akumulacije abnormalnih proteina je remećenje sposobnosti ćelija u otklanjanju oštećenih proteina, što što dovodi do pojačanog stresa u ćeliji, akumulaciji oštećenih proteina/organela, i aktivaciji puteva apoptoze, koje je uzrokovano hiperaktivacijom mTOR signalnog puta, tako što blokira ULK1 kompleks, što onemogućava početak autofagije, kao kod AB (13). Kod PB, kao i kod AB dolazi do poremećaja u mikrookruženju CNS-a, na identičan način (10).PB se ne može objasniti samo jednim mehanizmom, obično je kombinacija genske predispozicije, proteostatskih poremećaja, oksidativnog i metaboličkog stresa, glijalne aktivacije i potencijalno uticaja sredinskih faktora (6).

1.2.3. Mehanizmi nastanka amiotrofne lateralne skleroze

Kao i u prethodno opisanim mehanizmima nastanka neurodegenerativnog oboljenja i kod amiotrofične lateralne skleroze (ALS) je vodeći uzrok formiranja nakupina toksičnih proteinskih kompleksa. Proteini TDP-43 se pogrešno savijaju i akumuliraju unutar ćelija, što posledično remeti normalne ćelijske funkcije i transport i dovodi do toksičnosti i propadanja motornih neurona (13). Motorni

neuroni, posebno, su osetljivi na energetske deficite. Kada dođe do njegovog patološkog premeštaja iz jedra u citoplazmu, disfunkcije mitohondrija, smanjenje proizvodnje ATP-a, poremećaj u eliminaciji slobodnih radikala i oksidativni stres doprinose njihovoj osetljivosti i smrti (13).Eksitotoksičnost i kalcijumski disbalans nastaju prekomernom stimulacija glutamatnih receptora i mogu izazvati prekomerni ulazak kalcijuma u neurone, što dalje aktivira toksične puteve, dodatno oštećuje mitohondrije, pospešuje produkciju ROS, destabilizuje ćeliju i vodi ka apoptozi ili nekrozi i pretstavlja još jedan od brojnih mehanizama u nastanku i razvoju ovog oboljenja (13).U ALS, ekscitotoksičnost je najbolje opisan patofiziološki mehanizam, koji se zasniva na smanjenoj ekspresiji glutamatnog transportera EAAT2 (GLT-1) u astrocitima, a rezultat toga je akumulacije glutamata u sinaptičkoj pukotini. Kada je produženo stumulisanje glutamatnih receptora događa se masivan ulazak Ca^{2+} u motorne neurone, destabilizaciju mitohondrija i aktivaciju apoptotskih puteva, što direktno doprinosi njihovoj smrti (10,13).Neuroinflamacija i glijalna disfunkcija se i ovde javlja kao izuzetno štetna pojava, kao kod većine drugih bolesti. Aktivacija glijalnih ćelija kao posledica stres, agregate i ćelijska oštećenja pojačava upalu, produkciju proinflamatornih citokinina (TNF-α, IL-1β, IL-6) i dodatnu toksičnost po motorne neurone vodeći ih u smrt na nivou korteksa, moždanog stabla i kičmene moždine (6,13).Astrociti doprinose patologiji gubitkom funkcije preuzimanja glutamate, što zajedno sa inflamatornim procesima void ka ekscitotoksičnosti i ubrzanom degeneracijom neurona (6).Disfunkcija KMB smatra se sekundarnim patološkim mehanizmom kod ALS. Hronična inflamacija i oštećenje integriteta KMB doprinose pojačanoj neuroinflamaciji i povećanoj senzitivnosti motornih neurona na toksične signale koji dolaze iz periferije, čime mogu doprineti progresiji neurodegeneracije (6,13).Kod ALS, kao i kod AB prisutna je sinaptička disfunkcijakoja započinje započinje na nivou neuromišićne spojnice, gde dolazi do gubitka sinaptičke komunikacije između motornih neurona i mišića. Ovaj proces uključuje poremećaj aksonskog transporta, disfunkciju glutamatne homeostaze i povećanu ekscitotoksičnost, što doprinosi progresivnom gubitku motornih neurona. Kao i kod ostalih neurodegenerativnih oboljenja neadekvatno uklanjanje pogrešnih ili oštećenih proteina ubrzava samu degeneraciju, tako da, poremećaj proteostaze i degradacionih puteva zajedno sa drugim mehanizmima nalazi se u osnovi oboljenja (13). I kod ovog oboljenja, zbog svih navedenih faktora dolazi do poremećaja u mikrookruženju CNS-a (7).

1.2.4. Mehanizmi nastanka Huntingtonove bolesti

Jedan od dominantnih uzroka nastanka Huntingtonove bolesti (HB) je mutacija u genu HTT koja proizvodi mutirani protein sa produženim poli-glutaminskim nizom, koji je sklon pogrešnom savijanju i agregaciji (6,13). Kada dođe do agregacija, one remete normano funkcionisanje ćelija,

pogotovo u specifičnim regijama mozga, kao što su bazalne ganglije. Samim tim, ovaj protein koji nastaje kao posledica već pomenute mutacije može se okarakterisati kao toksičan (13). I kod ovog oboljenja, jedan od uzroka je poremećaj proteostaze i degradacionih sistema, zato što mutirani protein i posledično nastale agregacije dodatno opterećuju ćelijske mehanizme uključene u procese čišćenja štetnih proteina ili organela, direktno oštećuje mitohondrije, remeti transkripciju gena za mitohondrijalne proteine inhibira PGC-1α, glavnog regulatora mitohondrijalne biogeneze i povećava oksidativni stres, što za posledicu ima smanjen broj mitohondrija ili prisustvo disfunkcionalnih mitohondrija, pad ATP-a, naročito u neuronima *strijatuma* i neuroni ostaju bez energije za osnovne funkcije i polako propadaju (6,13). Sve ovo rezultira neefikasnim sistemima, nakupinama toksina, vodeći ćeliju u smrt (6,13).Hronična neuroniflamcija kod HB se javlja rano i pre pojave prvih simptoma bolesti, u vezi je sa dugotrajnom aktivacijom mikroglije, zbog prisustva mHTT-a. Posledično dolazi do oslobađanja proinflamatornih citokinina, oštećenja neurona posebno u *strijatumu*. Dodatno, promene u kinureninskom putu mogu povećati neurotoksičnost, a povišeni nivoi inflamatornih citokina u perifernoj krvi pokazuju i na sistemsku komponentu inflamacije. Zbog toga hronična inflamacija dodatno doprinosi progresiji neurodegeneracije, kao i razvoju kognitivnih i motoričkih poremećaja (6,13). Još jedna posledica nastala zbog toksičnosti mutiranog huntingtin proteina je poremećen transport vezikula i fukcija sinapsi. Ovo je najizraženije u kortiko-strijatalnim vezama, gde dolazi do smanjene sinaptičke plastičnosti i poremećaja glutamatne signalizacije, što doprinosi ranoj disfunkciji *strijatuma*. Agregati i aktivacja glijalnih ćelija dovodi do promena u mikrookruženju, što umanjuje sposobnosti mozga da se regeneriše (6).

1.2.5. Mehnizmi nastanka multiple skleroze

Za razliku od klasičnih„proteinopatija“, multipla skleroza (MS) karakteriše se specifičnim patološkim mehanizmom zasnovanim na autoimunom odgovoru usmerenom protiv mijelina i mijelinskih ovojnica aksona. Međutim, i u MS su prisutni procesi neuronalne degeneracije i neurodegeneracije (13).Autoimuni “napad” na mijelin, odnosno, imuni sistem (T-ćelije, B-ćelije, makrofagi) prepoznaje mijelin kao„strano“ i napada ga, a to dovodi do oštećenja mijelinskih ovojnica, gubitka mijelina i remeti brz i efikasan prenos nervnih impulsa (13). I ovde se javlja upala, glijalna aktivacija i imunološka disfunkcija, gde glijalne ćelije (mikroglija, astrociti) oslobađaju upalne citokinine (TNF-α, IL-1β, IL-6) i upalne molekule koji oštećuju mijelin i aksonske strukture, mikroglija se zadržava u M1 proinflamatornom fenotipu, dok astrociti pod uticajem proinflamatornih signala prelaze u A1 fenotip, koji je toksičan, tako da, i ovde inflamacija učestvuje u degeneraciji nerava i formira začarani krug kao kod AB (6,13). Razlika između inflamacije u AB i MS je što na prethodno naveden proces

dodatno se uključuje i autoimuni mehanizam, ali u kasnijim fazama bolesti sve se bazira na neurodegeneraciju i proces biva sličan kod neurona i aksona (10,12,14). Kada se javi oštećenje KMB, imune ćelije mogu proći iz periferije u mozak i samim tim doprineti inflamaciji, koja je primarni, dominantan i čest uzrok neurodegeneracije u odnosu na AB, gde predstavlja sekundarni uzrok (13).U isto vreme, oksidativni stres dodatno oštećuje mitohondrije i doprinosi aksonskom propadanju (10,14). Dugotrajna demijelinizacija, gubitak mijelina i ponovljeni upalni napadi dovode do oštećenja aksona, gubitka sinapsi i na kraju smrti neurona. To se manifestuje klinički progresivnim neurološkim tegobama (6,13).Kod MS, poremećaj mikrookruženja je sekundarna pojava primarno uzrokovana autoimunim odgovorom, dugotrajnom inflamacijom i demijelinizacijom (10,14).

1.3. Ograničenja trenutnih terapijskih strategija u lečenju neurodegenerativnih bolesti

Neurodegenerativne bolesti, kao što su AB, PB, ALS, HB i MS, predsavljaju veliki izazov za lečenje, jeruprkos dosadašnjem napretku medicinskih nauka, još uvek ne postoji terapija koja trajno zausavlja ili preokreće progresivni tok gubitka neurona, koji predstavlja osnovni uzrok, odnosno posledicu već pomenutih oboljenja (14). Lečenje koje je trenutno aktuelno, uglavnom je usmereno na ublažavanju simptoma, a ne na obnavljanju samih neurona (12,14).

Kod AB popularne terapije uključuju lekove koji modulišu neurotransmitersku aktivnost, uglavnom su to inhibitori holinesteraze i antagonisti NMDA receptora. Ovi lekovi mogu neznatno ublažiti simptome i usporiti progresivni tok pada kognicije, ali ono što je najvažnije ne mogu preokrenuti tok neurodegeneracije (15,16). Dok sa druge strane postoje imunoterapije, koje ciljaju direktno patološke proteine (kao što su Aβ ili tau), koje imaju ograničen klinički efekat, odnosno, smanjenje patoloških markera ne mora nužno da označava značajan oporavak kognicije, a terapije su često skupe, sa neželjenim sporednim efektima, i primenjuju se u ranoj fazi, što je kod mnogih pacijenata kasno dijagnostikovanih već praktično bez velikog efekta (17,18). Bez obzira, što ovakav tip terapija predstavlja najnoviju metodu nije nužno efikasan u regeneraciji izgubljenih neurona(17,18). Dakle, i posle decenija istraživanja i primene lekova, terapija za AB ostaje pretežno simptomatska, odnosno “disease-modifying minimalno”, odnosno, nedovoljna da ispuni osnovnu potrebu: vraćanje ili tehničku obustavu gubitka neurona i stabilno usporavanje toka bolesti (15,18).

Kod PB terapija je uglavnom bazirana na nadoknadi dopamina (pr. dopaminski lekovi). Ova terapija znatno ublažava motoričke simptome i poboljšava kvalitet života u kratkom i srednjem roku. U težim slučajevima mogu se primeniti invazivnije metode poput duboke moždane stimulacije (DBS) (14).

Kod MS, terapije (imunomodulatorne, imunoterapijske) mogu smanjiti broj relapsa ili usporiti tok kod određenih oblika bolesti, ali ne nude sigurnu regeneraciju demijelizovanih puteva i njihov efekat je ograničen kod progresivnih oblika (14).

Kod bolesti poput HB i ALS, terapijske opcije su još skromnije, jer dostupni su uglavnom lekovi koji ublažavaju simptome ili eventualno usporavaju napredovanje, ali ne postoji terapija koja obnavlja izgubljene neurone niti značajno menja klinički tok bolesti (14).

Trenutni razlozi zašto postojeće terapije nisu dovoljne su: multifaktorska patogeneza, što znači da kod ovih bolesti nije uključen samo jedan patološki mehanizam, već nastaju kao posledica više međusobno povezanih patoloških mehanizama (14,16,18).Simptomacka priroda, koju ne prati regeneracija, odnosno, hemijske terapije, stimulacija nervnih struktura, imunomodulacija ili neurostimulacija, mogu ublažiti tegobe ili drugim rečima smanjiti simptome, ali ne obnavljaju izgubljene neurone, niti rekonfigurišu neuralne mreže (15,17).Uzrok su tehnička i biološka ograničenja, što znači da lekovi često teško uspevaju da dostignu dovoljne koncentracije u mozgu (barijera krv–mozak, distribucija), ili ciljaju samo neke regione, dok su neurodegenerativni procesi globalni i heterogeni (17).Nezadovoljavajući klinički efekat i kratkotrajnost pretstavljaju da učinci terapije su često blagi, ne dovode do značajnog zaustavljanja progresije, a i kada daju privremeno poboljšanje efekat je kratkotrajan, često delimičan, i ne garantuje dugoročno stabilizovanje toka bolesti (15,16).Heterogenost kliničke slike i razlika među pacijentima znači da neurodegenerativne bolesti se manifestuju vrlo raznoliko, što otežava da jedna terapija bude efikasna za sve, posebno u okviru jedne bolesti (14). Zbog svega navedenog činjenica je da postojeće terapije većinom pružaju samo simptomatsko olakšanje, da su njihovi efekti ograničeni i neodrživi na duže staze, i da ne nude regeneraciju oštećenih struktura, shodno tome, ideja sa se pređe na razmatranje terapija zasnovanih na matičnim ćelijama potpuno je opravdana (14). Regenerativne metode imaju potencijal da kroz obnavljanje izgubljenih neurona, rekonstrukciju neuralnih puteva, neuroprotekciju i modulaciju patogenetskih procesa ponude nešto što klasične terapije nisu, mogućnost da zaista menjaju tok bolesti, a ne samo ublažavaju posledice (14).

2. Terapijski potencijal MSCs u lečenju neurodegenerativnih bolesti

2.1. MSCs i njihove biološke karakteristike

Mezenhimalne matične ćelije (engl. *Mesenchymal stem cells*, MSCs) predstavljaju multipotentne stromalne ćelije koje imaju sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije u više tipova ćelija mezenhimalnog porekla–osteoblaste, hondrocite, adipocite i miocite.MSCs se mogu izolovati iz više različitih tipova tkiva, kao što su koštana srž, zubna pulpa, pupčana vrpca, placenta, masno tkivo (2). Međunarodno društvo za ćelijsku terapiju je uspostavilo osnovne, minimalne kriterijume koje humane MSCs moraju da ispune kako bi bile definisane kao mezenhimalne i tkivne matične ćelije. Ti kriterijumi su: Prvo, kultura matičnih ćelija mora biti čvrsto adherirana za plastičnu podlogu. Drugo, MSCs moraju eksprimirati površinske markere CD73, CD90 i CD105, uz odsustvo ekspresije površinskih molekula CD34, CD45, CD14 (ili CD11b), CD79a (ili CD19) kao i HLA-DR. Treće, MSCs moraju imati sposobnost diferencijacije u osteoblaste, adipocite i hondrocite in vitro(1,19).

MSCs koje su izolovane iz koštane srži (engl. *Bone marrow–derived mesenchymal stem cells*, BM-MSCs) bile su prve adultne MSCs koje su identifikovane, i od tada predsavljaju jedan od najčešće korišćenih izvora MSCs. BM-MSCs pokazuju značajan potencijal za diferencijaciju, imaju izražen imuno-modulatorni kapacitet i široke mogućnosti kliničke upotrebe (1). Obično se dobijaju iz aspirata koštane srži uzetih sa ilijačnog grebena ili nakon sternalne punkcije. Iako je postupak uzimanja invazivan i inicijalni prinos ćelija nije veliki, a uz to broj MSCs opada sa starošću donora, BM-MSCs se ipak odlikuju odličnim sposobnostima proliferacije *in vitro* i imaju veliki potencijal za regeneraciju kostiju, obnavljanje hrskavice i modulaciju imunosnog odgovora (1,19).

S druge strane, MSCs izolovane iz masnog tkiva (engl. *Adipose-derived mesenchymal stem cells,*AD-MSCs) su vrlo atraktivne, zbog toga što masno tkivo predstavlja bogat i lako dostupan izvor (4). Procedura uzimanja je minimalno invazivna, prinos ćelija je visok, a stope rasta (proliferacije) ćelija nisu male. AD-MSCs pokazuju značajnu sposobnost da se diferenciraju u adipocite, što je prednost za određene primene, a često se uzimaju u obzir i za autolognu transplantaciju (4). Međutim, na kvalitet AD-MSCs utiču faktori kao što su starost donora, telesna masa i opšte zdravstveno stanje. Za razliku od BM-MSCs, AD-MSCs ne iskazuju ekspresiju određenih površinskih markera (npr. CD106), što ih razlikuje od koštano-sržnih MSCs (4).

Postoje i MSCs iz drugih izvora kao na primer, iz pupčane vrpce (engl. *Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells,*UC-MSCs) i iz placente (engl. *Placenta-derived mesenchymal stem cells,* PMSCs). Ove ćelije se dobijaju neinvazivnim tehnikama sakupljanja, imaju vrlo nizak imunogenitet, stabilan kapacitet proliferacije, i zbog toga se često razmatraju za alogene terapije(1).Te osobine su posebno značajne za kliničku primenu, uz manja etička pitanja u poređenju sa embrionalnim ćelijama. Osim toga, MSC se mogu izolovati i iz zubne pulpe (engl. *Dental pulp-derived mesenchymal stem cells,* DP-MSCs), često iz mlčnih zuba ili iz umnjaka, što daje mogućnost alternativnog izvora ćelija, bez etičkih dilema. DP-MSCs imaju nisku imunogenost i dobar regenerativni potencijal(1,19).

Postoje i alternativni izvori MSCs, kao što su: sinovijalno tkivo, menstrualna krv (što daje MenSCs), i drugi. Na primer, MSCs iz endometrijuma (iz menstrualne krvi) su poslednjih godina predmet intenzivnog istraživanja jer imaju visoku proliferativnost, nisku imunogenost, a njihovo dobijanje je neinvazivno, što eliminiše veći broj etičkih i praktičnih problema (3).

Kombinacija ovih različitih izvora MSCs, svaki sa svim svojim prednostima i nedostacima, pruža širok spektar mogućih terapijskih pristupa (3).

2.2. Uticaj MSCs na mehanizme nastanka neurodegenerativnih oboljenja

Uzimajući u obzir kompleksnost i brojnost mehanizama koji se nalaze u osnovi neurodegenrativnih oboljenja, kao i njihovu međusobnu interakciju, trenutne terapije koje ciljaju jedan patološki mehanizam nisu bile dovoljno efikasne. Sa druge strane, MSCs imaju izrazito širok spektar bioloških aktivnosti i imaju sposobnost da istovremeno modulišu mnoge od ovih procesa, čime predstavljaju jedan od najperspektivnijih kandidata u regenerativnoj terapiji neurodegeneracije (8,9,10,12,14).

Od važnosti je naglasiti da se većina efekata MSCs ne ostvaruje njihovom direktnom diferencijacijom u neuronske ili glijalne ćelije, već preko parakrinog delovanja(8,9,10,12,14). MSCs deluju poput bioloških regulatornih centara, koji putem lučenja širokog spektra biološki aktivnih molekula mogu uticati na okolne ćelije i menjaju patološko mikrookruženje CNS-a. Upravo ovakav parakrini način delovanja omogućava MSCs da u isto vreme utiču na više patoloških procesa, uključujući inflamaciju, oksidativni stres, proteostazu, ekscitotoksičnost i mitohondrijalnu disfunkciju, što predstavlja osnovu njihovog terapijskog potencijala u neurodegenerativnim oboljenjima (8,9,10,12,14).

Jedan od centralnih patoloških procesa,prvenstveno u AB, a javlja se i kod drugih neurodegenerativnih oboljenja, jeste agregacija pogrešno savijenih proteina. Ovi proteini formiraju toksične oligomere i fibrile koje remete sinaptičku transmisiju, narušavaju integritet mikrotubula, oštećuju aksonalni transport i aktiviraju glijalne ćelije. Utvrđeno je da MSCs značajno utiču na pomenuti patološki mehanizam putem aktivacije autofagije i proteasomalne degradacije, time što dolazi do povećanja ekspresije ključnih molekula kao što su Beclin-1 i LC3-II, kao i inhibicije mTOR puta, čime se pospešuje uklanjanje akumuliranih protein (8,9). Time može se reći da MSCs ispoljavaju proautofagijsko delovanje, ovo svojstvo omogućava brzo uklanjanje patoloških proteinskih agregata (9).

Takođe je pokazano da MSCs utiču na smanjenje hiperfosforilacije tau proteina zako što inhibišu kinazu GSK-3β i CDK5, što je posebno značajno u patogenezi AB (9).Na koji način dolazi do

hiperfosforilacije tau proteina? MSCs utiče na više signalnih puteva koji regulišu direktno aktivnost GSK-3β i CDK5. Prvi način je aktivacija PI3K/Aktsignalnog puta, tako što MSCs sekretuju IGF-1, HGF, BDNF, VEGF, ovi faktori kada dođu do neurona oni se vezuju za svoje receptore, receptor se aktivira PI3K (fosfatidil-inozitol 3-kinaza), PI3K menja određene lipide u membrani i to privlači i aktivira Akt (protein kinaza B). Aktivirani Akt štiti neuron i isključuje štetne enzime, jer kada je on aktivan inhibira GSK-3β (kinazu koja fosforiliše tau), smanjuje apoptozu, poboljšava ćelijski metabolizam, stabilizuje mikrotubule, povećava preživljavanje neurona, zato je PI3K/Akt put neuroprotektivan (8,9,10,20). Ovim zaključujemo da MSC imaju neuroprotektivan efekat (8,10).

MSCs indukuju porast aktivnosti enzima neprilizina i insulin-degrading enzima, koji fiziološki učestvuju u razgradnji Aβ, čime direktno doprinose smanjenju amiloidnih depozita, čime možemo zaključiti MSCs ispoljavaju izražen antiamiloidogeni efekat (8,9).

Oksidativni stres predstavlja još jedan univerzalni mehanizam oštećenja prisutan u AB, al ii u PB, ALS, HB, i MS. U PB dopaminergični neuroni imaju najveći metabolički stres zbog intenzivne potrošnje kiseonika, u ALS mitohondrijalna disfunkcija uzrokuje povećanu proizvodnju ROS, dok mutantni huntingtin i Aβ dodatno oštećuju mitohondrije i pojačavaju oksidativni stres (8,9,13). Utvrđeno je da MSCs efikasno smanjuju oksidativni stres putem sekrecije antioksidativnih enzima, uključujući superoksid-dismutazu (SOD1/2), katalazu i glutation-peroksidazu, koji neutralizuju slobodne radikale i smanjuju lipidnu peroksidaciju (8,10). Ovi enzimi pretvaraju superoksid ($O_2•–$) u manje reaktivne molecule, neutrališu vodonik-peroksid (H_2O_2) i sprečavaju nastanak hidroksilnih radikala (•OH) koji su najtoksičniji, time se smanjuje ROS nivo i upućava lipidna peroksidacija u neuronalnim membranama. Ovim zaključujemo da MSCs imaju antioksidativni efekat (8,10).

Ekscitotoksičnost, koja nastaje usled prekomerne stimulacije glutamatnih receptora i unosa Ca^{2+}, posebno je izražena u ALS, a javlja se i u AB i PB (7,8). MSCs utiču na ovaj proces tako što povećavaju ekspresiju EAAT2/GLT-1 transportera u astrocitima, ovi transporteri uklanjaju višak glutamata iz sinaptičke pukotine, čime sprečavaju kalcijumsko preopterećenje neurona. Takođe je pokazano da MSCs stabilizuju funkciju NMDA i AMPA receptora i smanjuju njihovu osetljivost na toksične signale (8,9,14).MSCs utiču na NMDA i AMPA receptore na tri različita nivoa: smanjenje glutamata u sinapsi, na već prethodno opisan način, što pretstavlja najvažniji put,sekrecijom neurotrofina koji menjaju fosforilaciju receptora (BDNF, GDNF, IGF-1), jer ovi neurotrofini utiču na fosforilaciju podjedinica NMDA receptora (NR2A/NR2B) i fosforilaciju AMPA podjedinica (GluR1/GluR2). Ovo dovodi do stabilizacije receptora, smanjenje njihove osetljivosti na prekomernu aktivaciju i poboljšanje sinaptičke plastičnosti, drugim rečima MSCs menjaju reaktivnost receptora putem signalne modulacije (8,9,14).I treći nivo pretstavlja smanjenje oksidativnog i i inflamatornog stresa. Posledica oksidativnog stresa je promenjena struktura receptora, a posledica lučenja

inflamatornih citokinina je povećana osetljivost NMDA receptora. MSCs smanjuju TNF-α, IL-1β, ROS, čime se smanjuje i patološka senzitivnost NMDA/AMPA receptora, a ovo je važno jer su ovi receptori dosta osetljiviji u uslovima inflamacije, kao u ALS i AB (8,9,14). Drugim rečima MSCs imaju antiekscitotoksični efekat (14).

Hronična neuroinflamacija je ključni patološki mehanizam prisutan u svim neurodegenerativnim oboljenjima. MSCs pokazuju snažan antiinflamatorni efekat time što sekretuju IL-10, TGF-β, prostaglandin E2 i IDO, koji preusmeravaju mikrogliju iz proinflamatornog M1 u neuroprotektivni M2 fenotip (8,9,10).Molekularni mehanizam koji je u osnovi procesa preusmeravanja mikroglije iz M1 u M2 fenotip pod uticajem MSCs ima 4 glavna puta. Za početak, poznato je da mikroglija ima dva glavna fenotipa, tj M1- proinflamatorni i neurotoksični i M2- antiinflamatorni, reparativni, fagocitni. U AB, PB, ALS i HB mikroglija je hronično zaključana u M1 stanju, što znači da oslobađa TNF-α, IL-1β, IL-6, NO, ROS i pojačava neurodegeneraciju (9). Prvi mehanizam MSCs koji utiče na ovaj proces je sekrecija IL-10, koji je najjači antiinflamatorni citokin. IL-10 se vezuje za IL-10 receptor na mikrogliji i aktivira STAT3 signalni put, koji ima za posledicu smanjenu ekspresiju proinflamatornih gena (TNF-α, IL-1β) i povećava ekspresiju M2 markera (Arg-1, Ym1, CD206), što rezultira prelazom mikroglije iz M1 u M2 fenotip (8,9,10,21). Drugi mehanizam se bazira na tome da MSCs luče TGF-β, koji inhibira NF-κB, time je TGF- β glavni "prekidač" inflamacije. Treći mehanizam se bazira na tome da PGE2 iz MSC se vezuje za EP2/EP4 receptore na mikrogliji i pokreće cAMP/PKA signalizacija, koja za posledicu ima povećanje sinteze IL-10 unutar same mikroglije, utišavanje proinflamatornih signala, podsticanje prelazka u M2 fenotip(9,11,20).Četvrti mehanizam se zasniva na tome da IDO(indolamin-2,3-dioksigenazu) iz MSCs razgrađuje triptofan u kinureninske metabolite. Ovi metaboliti potiskuju aktivaciju M1 mikroglije, povećavaju ekspresiju M2 gena i smanjuju inflamatorne signale ka neuronima. Ovim možemo zaključiti da MSCs imaju snažan antiinflamatorni efekat (9,11,20).

MSCs ispoljavaju imunomodulatorno i neuroprotektivno dejstvo u neurodegenerativnim bolestima, kroz sposobnost da utiču na glijalni odgovor koji je bitan u progresiji ovih stanja (20).Pokazano je da MSCs mogu da spreče prelazak astrocita u toksični A1 fenotip, koji pod dejstvom mikroglijalnih signala (TNF-α, IL-1α i C1q) počinje aktivno da oštećuje neurone i sinaptičke veze. MSCs to postižu tako što luče IL-10, TGF-β, PGE2 i IDO, molekule koji inhibišu aktivirane inflamatorne puteve, kao što su NF-κB i STAT3, pa astrociti umesto A1 profila prelaze u zaštitni A2 fenotip, koji karakteriše lučenje neurotrofina i podrška regeneraciji oštećenih neurona (20). Na taj način MSCs prekidaju „začarani krug“ mikroglijalne aktivacije i astrocitne toksičnosti koji je naročito izražen u AB (20).

U MS, MSCs dodatno utiču na ključne komponente adaptivnog imuniteta, koji je primarni pokretač demijelinizacije(10,14). MSCs smanjuju diferencijaciju Th1 i Th17 limfocita tako što inhibiraju

sintezu citokina, poput IL-6, IL-12 i IL-23, koji su neophodni za njihov razvoj, dok istovremeno povećavaju broj regulatornih T-ćelija (Treg) podsticanjem ekspresije transkripcionog faktora FoxP3. Treg ćelije predstavljaju glavni mehanizam „kočenja“ autoimunskog odgovora, pa njihovo povećanje direktno smanjuje inflamaciju u CNS-u(10,12). Dodatno, MSCs utiču i na B-limfocite tako što inhibiraju njihovu proliferaciju i smanjuju sposobnost stvaranja autoantitela i prezentacije antigena T-ćelijama. Posledica ovoga je smanjenje intenziteta autoimunskog napada na mijelin, što klinički usporava progresiju bolesti (10,14). Ovde se, takođe, uočava izraženo imunomodulatorno dejsvo MSCs (10,14).

Poremećaj proteostaze, koji se javlja u svim proteinopatijama (AB, PB, ALS, HB), dodatno doprinosi progresiji bolesti tako što dolazi do akumulacije pogrešno savijenih proteina, preopterećenja ER (endoplazmatičnog retikuluma) i aktivacije stresnih puteva (7,8). MSCs utiču na obnovu proteostaze aktivacijom autofagije, povećanjem aktivnosti proteasoma, smanjenjem ER stresa kroz inhibiciju PERK-CHOP signalnog puta, povećanjem ekspresije chaperon proteina poput Hsp70 i Hsp27, koji sprečavajupogrešno savijanje proteina (21).

Mitohondrijalna disfunkcija, prisutna u AB, PB, ALS i HB, i ona se može dodatno ublažiti dejstvom MSCs, koje mogu da obnavljaju bioenergetsku funkciju neurona i samim tim, smanjuju oksidativna oštećenja i stabilizuju mitohondrijalnu dinamiku (8,9,10,13).Poznato je da u osnovi mitohondrijalne disfunkcije leži nekoliko patoloških procesa, a to su: pad ATP-a, smanjenu oksidativnu fosforilaciju, povećanje ROS, poremećaj mitohondrijalne dinamike (fuzija/fizija), oštećen transport mitohondrija duž aksona, narušenu funkciju Ca^{2+} homeostaze (12). MSCs na ove procese utiču kroz nekoliko dokazanih mehanizama. Prvi mehanizam se zasniva na tome da MSCs aktiviraju PGC-1α, koji je glavni regulator u stvaranju novih mitohondrija. MSCs potstiču njegovu aktivaciju kod neurona preko Akt/CREB signalnog puta, preko AMPK aktivacije, što potstiče energetski status neurona, i time što smanjuju inflamatorni i oksidativni stres na mitohondrije. Posledica ovoga je da neuroni stvaraju nove mitohondrije, koje bivaju funkcionalne (8,12). Drugi način kojim MSCs popravljaju mitohondrijalnu disfunkciju, tako što smanjuju mitohondrijalni ROS i oksidativna oštećennja. MSCs sekretuju antioksidativne enzime (SOD, katalaza, GPx), aktiviraju Nrf2/ARE put u neuronima, smanjuju lipidnu peroksidaciju, povećavaju redukovani glutation (GSH) (8,9,10). Još jedna od prednosti MSCs u ovom slučaju je da povećavaju mitohondrijalni membranski potencijal ($\Delta\Psi m$). U PB, ALS i AB $\Delta\Psi m$ je patološki snižen, a MSCs imaju mogućnost da ga vrate u normalu putem poboljšanja elektron-transportnog lanca, smanjenja oksidativnih oštećenja kompleksa I i IV i stabilizacije Ca^{2+} homeostaze. Dakle, kada je $\Delta\Psi m$ normalizovan, to rezultia boljom sintezom ATP-a (8,9). MSCs poboljšavaju aksonalni transport mitohondrija, što je još jedna prednost MSCs, koja reguliše mitohondrijalnu disfunkciju. Toksični proteini (Aβ, tau, α-sinuklein) remete kinesin/dinein motore, što je u osnovi AB

(patološki tau) i PB (α-sinuklein)(8,9).MSCs to regulišu tako što smanjuju tau fosforilaciju, smanjuju sinaptički stres, obnavljaju integritet mikrotubula, povećavaju nivo BDN, koji direktno utiče na transport mitohondrija. Sve ovo rezultirano je time što mitohondrije ponovo stižu do sinapsi i tada sinaptička funkcija biva obnovljena (8,9). I poslednji proces koji je od značaja ima ulogu u prenosu funkcionalnih mitohondrija sa MSCs na neurone (tunneling nanotubes). Kada se MSCs nađu u okruženju gde vlada visok oksidativni stres imaju tendenciju da formiraju tunneling nanotubes (TNT) i kroz njih prenose zdrave mitohondrije oštećenim neuronima. Ovo je primećeno kod AB modela, ALS modela i kod hipoksičnih oštećenja (11,20,22). U MS, iako mitohondrijalna disfunkcija nije primarni mehanizam, inflamacija značajno doprinosi sekundarnom oštećenju mitohondrija, što MSCs, takođe uspešno ublažavaju(11,20,22).

Oštećenje KMB karakteristično je za MS, ali i za AB, gde njena propustljivost dovodi do ulaska perifernih imunskih ćelija i inflamatornih molekula u CNS, što je već detaljno objašnjeno u uvodnom delu (8,9,13).MSCs doprinose obnovi KMB, tako što najpre umiruju upalni proces, koji je glavni uzrok njene degeneracije. Kada je mozak izložen hroničnoj inflamaciji, aktivira se NF-κB signalni put koji pojačava proizvodnju proinflamatornih citokina i metaloproteinaza, posebno MMP-9(8,9).Ovi molekuli direktno razgrađuju proteine koji zaptivaju spojeve između endotelnih ćelija (occludin, claudin-5 i ZO-1), zbog čega barijera biva propustljiva i više ne može da štiti mozak od ulaska perifernih imunskih ćelija. MSCs menjaju tok ovog procesa, tako što luče IL-10, TGF-β i PGE2, molekule koji efikasno utišavaju NF-κB, što posledično zaustavljaja dalje stvaranje upalnih molekula i MMP-9(8,9).Kada se pritisak inflamacije smanji, MSCs dodatno „pomažu“ endotelijalnim ćelijama da obnove svoju strukturu tako što putem faktora kao što su VEGF-B, ANG-1 i HGF aktiviraju PI3K/Akt signalni put, koji podstiče pojačanu sintezu i ponovnu organizaciju tight-junction proteina, čija je osnovna funkcija održavanje čvrstih veza između ćelija. Istovremeno, MSCs povećavaju nivo njihovih prirodnih inhibitora (TIMP-1 i TIMP-2), čime se MMP-9 dodatno kontroliše i sprečava se njegovo štetno dejstvo. Kao rezultat svega ovoga, spojevi između endotelnih ćelija ponovo postaju čvrsti, propustljivost barijere se smanjuje KMB povraća svoju zaštitnu ulogu (8,9).

U MS poseban terapijski značaj ima sposobnost MSCs da stimulišu remijelinizaciju. MSCs sekreti, bogati PDGF, IGF-1 i FGF-2, aktiviraju proliferaciju i diferencijaciju oligodendrocitnih progenitora, povećavaju ekspresiju mijelinskih proteina (MBP, PLP) i doprinose reparaciji aksona (10,14). Ovaj mehanizam predstavlja jedinstvenu prednost MSCs, jer nijedna standardna terapija MS ne poseduje sposobnost aktivne regeneracije mijelina. Čime se još jednom potvrđuje regenerativni potencijal MSCs (10,14).

2.3. Prednosti primene MSCs u lečenju neurodegenerativnih oboljenja

MSCs poseduju brojne prednosti u potencijalnoj terapiji neurodegenerativnih oboljenja. Brojne prednosti MSCs se zasnivaju na njihovoj bezbednosti, stabilnosti i doslednosti biološkog ponašanja kada se koriste u kontrolisanim i standardizovanim uslovima(3,4,9,10). Neurodegenerativna oboljenja predstavljaju izrazito izazovan i kompleksan problem, uz to se pokazalo da grade dinamičan biološki prostor u kome se istovremeno odvija više patoloških procesa. MSCs, kao takve, sa svim svojim benefitima koje poseduju, pokazale su se u brojnim istraživanjima kao dobra i prihvatljiva terapijska opcija, koja se lako podnosi, ne izazivajući ozbiljne neželjene reakcije i mogu se primenjivati na više načina, pri čemu organizam terapiju dobro podnosi i ne dolazi do narušavanja njegovih fizioloških funkcija(3,4,9,10).Njihova bezbednost ne proizilazi iz jedne izolovane osobine, već iz kombinacije njihovih bioloških karakteristika, sposobnosti imunološke adaptacije i njihovog neinvazivnog odnosa prema tkivima u koja se unose (3,4,9,10).

Među prvim prednostima MSCs izdvojila bih njihovu izazito nisku imunogenost. One ne izražavaju visoke nivoe molekula glavnog kompleksa histokompatibilnosti klase II (engl. *Major histocompatibility complex II,*MHC-II), niti kostimulatornih molekula kao što su CD80 i CD86, koji su zapravomolekuli na površini ćelija koji predstavljaju antigene imunitetu (23,24). Ovi molekuli imaju ulogu da prikažu delove proteina (antigene) T-limfocitima, aktiviraju CD4+ T-pomoćničke ćelije i samim tim pokrenu snažan imunski odgovor. MHC-II su prisutni na dendritskim ćelijama, makrofagima, B-limfocitima, dok MSCs gotovo da ih ne izražavaju, a to znači da ne aktiviraju jak imuni odgovor(23,24).CD80 (B7-1) i CD86 (B7-2) su kostimulatorni molekuli na površini profesionalnih antigen-prezentujućih ćelija. Njihova uloga se zasniva na vezvanju CD28 na T-ćelijama, na tome da ne daju drugi signal potreban za potpunu aktivaciju T-limfocita, a bez njih imunski odgovor bude slab ili se uopšte ne desi. Odnosno, prvi signal je antigen prezentovan preko MHC, a drugi aktivacija preko CD80 i CD86. S obzirom da MSCsne izražavaju CD80 i CD86, nemaju mogućnost da snažno aktiviraju T-limfocite (23,24). Zahvaljujući ovom svojstvu, MSCs se smatraju ćelijama koje se dobro podnose u autolognoj i u alogenoj primeni, što izražava njihov terapijski potencijal i dostupno intervencijsko rešenje (3,4,9,10,25).Njihova druga karakteristična i bitna prednost se zasniva na sposobnosti da se ponašaju u skladu sa tkivnim okruženjem, uz odsustvo tendencije da se nekontrolisano dele i uzrokuju time nastanak tumora. Brojna istraživanja su pokazala da MSCs nemaju inherentni tumorigeni potencijal kada se izoluju, kultivišu i apliciraju u skladu sa međunarodno preporučenim protokolima, pogotovo kada se vodi računa o ograničenju broja pasaža, kontroliše kariotip i poštuje se primena standardizovanih dobre proizvođačke prakse (engl. *Good Manufacturing Practice,*GMP) uslova (4,26). Istraživanja su pokazala da kada se MSCs nađu u toksičnom ili zapaljenskom okruženju

CNS-a aktivnost im ostaje regulisana i ograničena, jer ne postoje dokazi o transformaciji ili stvaranju neželjenih tumorskih struktura. Ovo svojstvo ih čini jednim od najbezbednijih ćelijskih tipova za istraživačku i potencijalno terapijsku primenu u neurologiji (4,26).

Što se tiče protokola za primenu MSCs, oni su u zadnjih par godina sve standardizovaniji i jasnije definisani. Najčešći načini primene su intravenska, intratekalna i, u pojedinim specifičnim situacijama, intraparenhimalnu aplikacija(25,27).Svaki od ovih načina ima svoje prednosti i ograničenja, ali se smatraju visoko bezbednim. Intravenska metoda se smatra i opsiuje kao najjednostavnija i najbezbednija, zbog široku raspodele MSCs bez direktnog narušavanja struktura CNS-a. Intratekalna primena, koja se zasniva na uvođenju ćelija u cerebrospinalnu tečnost je takođe, okarakterisana bezbednom kada se sprovodi u kontrolisanim medicinskim uslovima i postoji veća mogućnost da MSCs dopru do oštećenih neuronskih mreža(25,27).Primenom MSCs lokalno, direktno u moždani parenhim je najinvazivniji pristup od svih navedenih. Iako neke studije pokazuju da posledice ovakve metode mogu biti značajna oštećenja tkiva, edemi ili hemoragije(ako se procedura ne izvodi u optimalnim tehničkim uslovima), ne umanjuje značajnost da ove ćelije imaju visok stepen biokompatibilnosti, niti osporava ovu metodu, ako se procedura izvodi u optimalnim tehničkim uslovima (25,27).

Još jedno svojstvo, zbog čega se MSCs se smatraju bezbednim i terapijski pogodnim je njihova predvidiva biološka dinamika nakon aplikacije. Njihov fizički opstanak je vremenski i ograničen, zvog čega se ne zadržavaju u tkivu trajno, ali dejstvo im je efektivno i brzo, kroz mehanizme reakcija sa lokalnim ćelijama, uz to, dolazi i do imunološke modulacije, antiinflamatornih procesa i podsticanja reparacije. Nakon ovoga, ćelije se trajno gube iz tkiva i za sobom ne ostavljaju neželjene ili štetne tragove(25,26,27). U njihovom slučaju prolaznost je pozitivna karakteristika, jer se umanjuje mogućnost od dugoročnih rizika, što nije slučaj sa terapijama u koje ulaze ćelije koje se trajno integrišu, jer samim tim nose veću mogućnost od komplikacija (25,26,27).

Efikasnost i bezbednost MSCs terapije u velikoj meri zavisi i od standardizacije protokola u pripremi ćelija. Danas je prisutna međunarodna saglasnost da se MSCs moraju definisati u skladu sa morfološkim, fenotipskim i funkcionalnimkriterijumima (3). Zbog postojanja mogućnosti da se umesto MSCs nađu mešavine različitih stromalnih hematopoetskih populacija, ovi standardi eliminišu takvu mogućnost i garantuju čistoću populacije MSCs (3,4). Bilo bi poželjno da MSCs, koje se koriste u terapijama budu poreklom iz mlađih tkiva, kao što je pupčana vrpca ili masno tkivo, zbog većeg poliferativnog potencijala, stabilnije imunomodulacije i manjeg rizika od akumulacije genetskih oštećenja tokom kulture (10,25). Iz ovoga proističe važnost za terapije namenjene starijim pacijentima, jer bi autologne MSCs imale ograničene biološke kapacitete (9,26).

Visok stepen adaptacije je od velike važnosti kod ovakvog tipa degeneracije, a tu osobinu poseduju MSCs. Njihov biološki odgovor nije agresivan, već modulatoran sa pozitivnim uticajem na zapaljenje, oksidativni stres i homeostazu (9,28). MSCs ne remete postojeće neuronske mreže, ne menjaju strukturu tkiva na štetan način i ne izazivaju nagle promene u homeostazi, već deluju smirujuće, zaštitno i koordinisano sa prirodnim reparativnim procesima organizma, što je od velike važnosti kod svakog vrsta oboljenja, a naročito kod neurodegenerativnih (4,10,27).

Sve navedeno potvrđuje da se primena MSCs zasniva na čvrstim temeljima bezbednosti, biološke kompatibilnosti i jasno definisanih procedura, što ovoj terapiji daje stabilnost i kredibilitet. Upravo, zbog toga MSCs danas predstavljaju jednu od najobećavajućih platformi u oblasti regenerativne neurologije, terapiju koja se može dalje nadograđivati optimizacijom doza, prilagođavanjem vremena primene i kombinovanjem sa drugim regenerativnim pristupima (9,10,25,26).

2.4. Ograničenja i izazovi primene MSCs u neurodegenerativnim oboljenjima

Već je poznato da MSCs predstavljaju jedan od najperspektivnijih istraživačkih sredstava u savremenoj neurologiji, međutim u isto vreme poseduju određena ograničenja, do čije spoznaje tek dođe kada se pristupi terapiji neurodegenerativnih bolesti(6,7,9,10).Teoretski, MSCs imaju izuzetan potencijal da budu gotovo idealan "terapijski alat" u lečenju već pomenutih oboljenja, jer poseduju određene prednosti, kao što su fleksibilnost, prilagodljivost, smiruju inflamaciju, utiču na oksidativni stres, učestvuju u reparativnim procesima i komuniciraju sa oštećenim tkivom (6,7,9,10). Međutim, kada dođe do praktične primene potrebno je uzeti u obzir da se MSCs suočavaju sa kompleksno narušenim, biološki nestabilnim okruženjem, koje utiče na njihov potencijal. Još uvek prevazilaženje ovih prepreka pretsavlja naučni izazov, takoda je neophodno što bolje i detaljnije razumeti same prepreke (6,7,9,10). U daljem tekstu navešću prepoznatljive i karakteristične okolnosti, koje upravo uskraćuju potencijal MSCs.

Prva prepreka, koja je izdvojena je prirodna heterogenost MSCs populacija. Suština ove karakteristike je da MSCs zapravo čine spektar stromalnih ćelija čije karakteristike zavise od porekla, uslova izolacije, starosti donora i dužine kultivacije, a nisu jeinsvena grupa ćelija, koja je tačno definisana(19,25,26).MSCs iz pupčane vrpce, koštane srži i masnog tkiva imaju zajedničke karakteristike, ali se funkcionalno razlikuju. Njihova različitost se ogleda u stopi poliferacije, imunomodulatornom profilu, otpornosti na stres i sposobnosti prilagođavanja zapaljenskim okruženjima

(19,25,26). Čak i MSCs koje se nalaze u tkivu istog porekla mogu imati različite varijacije u zavisnosti od nutritivnih uslova kulture, broja pasaža i metaboličkog statusa. Ova pojava onemogućava da terapija MSCs bude uniformna(25,26).U praksi ovo se manifestuje kroz primer grupe pacijenata, čije je oboljenje tretirano MSCs. Jedna tretirana grupa može da pokaže vidljivo poboljšanje, dok druga grupa može da pokaže neznatan efekat. Ovo ne proističe iz nefunkcionalnosti terapije ovim ćelijama, već iz toga što je početni materijal (MSCs populacija) sam po sebi biološki neujednačen (25,26).

Drugi izazov je sposobnost preživljavanja i adaptacije MSCsu izuzetno toksično neurodegenerativnom okruženju(8,9,24). U mozgu pogođenom AB ili drugim neurodegenerativnim bolestima odvija se simultani proces inflamacije, oksidativnog stresa, nakupljanja pogrešno savijenih proteina, mitohondrijalne disfunkcije i sinaptičke degradacije(8,9,27). Ovakvo okruženje predstavlja veliki izazov i za ovaj tip ćelija, koje inače karakteriše velika prilagodljivost, jer gube vitalnost. Obično, životni vek ovih ćelja u ovako metabolički narušenom okruženju je nekoliko dana i time se umanjuje vreme njihovog korisnog delovanja (8,9,27). Inače, funkcija MSCs, kao stabilizatora, odnosno ćelija koje potsiču regeneraciju, umiruju imuni sistem i smanjuju stres, nije najuspešnije moguća u ovakvom okruženju, jer MSCs ne stignu da se ukorene i postignu dugotrajnu funkcionalnost (8,9,27).

Još jedan problem koji postoji je fizička barijera mozga, odnosno KMB. Danas je često predstavljeno da je tokom procesa neurodgeneracije došlo do oštećenja KMB i da je zato lakše terapijskim ćelijama da prođu i ostvare svoj potencijal, međutim, njena funkcija nije u potpunosti izgubljena(27,28).Iako je oštećena, ona je još uvek selektivna i ograničava ulazak MSCs, pogotovo nakon intravenske primene, jer značajan deo ćelija ostaje biva “zatočen” u plućnoj mikrocirkulaciji ili se preraspodeli u perifernim organima (27,28). Posledica ovoga je da dovoljna količina ćelija ne dolazi direktno do mozga, što ukazuje da je efikasnost zavisna od sekundarnih signala, a ne od direktnog kontakta MSCs sa neuronima i glijom. Naveden problem se donekle prevazilazi intratekalnom i lokalnom aplikacijom, međutim, nisu ove metode pogodne sa sve vrste pacijenata, a ujedno su i invazivne(27,28).

Naredna preprka je funkcionalna stabilnost MSCs u stresnom okruženju. Bez obzira na sve prednosti MSCs, one nisu imune na promene izazvane proinflamatornim okruženjem, koje karakteriše proces neurodegeneracije. Kada su dugo izložene inflamatornim citokinima može doći do promene njihovog fenotipa i čak mogu preći u njihovo senescentno stanje, tokom kog mogu postati izvor sopstvenih zapaljenskih signala (10,26). Ovo je posebno bitno kod pacijenata koji su starije životne dobi, gde bi autologne MSCs mogle biti već oštećene ili metabolički iscrpljene, što dodatno smanjuje njihovu efikasnost (26).

Pored svega navedenog, javljaju se tehnička i translaciona ograničenja, koja dodatno usporavaju realizaciju MSCs terapije. Iako postoje minimalni kriterijumi definisanja MSCs (3), još uvek ne postoji saglasnost o optimalnoj dozi, učestalosti primene, fazi bolesti u kojoj je terapija najefikasnija, niti o najboljem izboru tkiva porekla MSCs (4,25). Nedostatak standardizacije još više otežava različita istraživanja i razvoj smernica za kliničku upotrebu. Dodatni izazov za terapije koje se baziraju na živim ćelijama je taj što se ćelije moraju pripremiti u GMP uslovima, transportovati i primeniti u kratkom vremenskom okviru, a svaki korak može uticati na njihov kvalitet i funkcionalnost (4,25).

Još jedan izazov koji je ovde prisutan, a ne tiče se samih MSCs, su same neurodegenerativne bolesti, jer je jako izazovno i teško formirati jednu terapiju za oboljenja koja karakterišu višeslojnost, progresivnost i to što su sistemaske. MSCs mogu smanjiti inflamaciju, ublažiti oksidativni stres, uticati na glijalnu aktivaciju i podržati preživljavanje neurona, ali one ne mogu u potpunosti zaustaviti nakupljanje toksičnih proteina, niti obnoviti već izgubljene neuronske mreže, što predstavlja njihov veliki nedostatak (26,27,28). Zbog toga se MSCs danas posmatraju kao terapija koja može usporiti propadanje i poboljšati funkcionalno stanje pacijenata, ali ne kao terapija koja se može rešiti problem u potpunosti. Njihov najveći potencijal leži multipotentnosti, koja ima blago izraženo dejstvo, što je prednost za složene procese, ali ujedno i nesostatak ako je cilj dramatičan napredak (26,27,28).

Sagledavši sve navedene faktore (biološka heterogenost, ograničeno preživljavanje, prepreke u isporuci, funkcionalna ranjivost i nedostatak standardizacije) može se razumeti zašto je terapija MSCs ujedno izazovna, al i obećavajuća. Sa sigurnošću može se reći da je neophodno dodatno usavršavanje terapije, kao i bolje razumevnje svih nedostataka(26,27,28).

3. Derivati MSCs-osnovne karakteristike

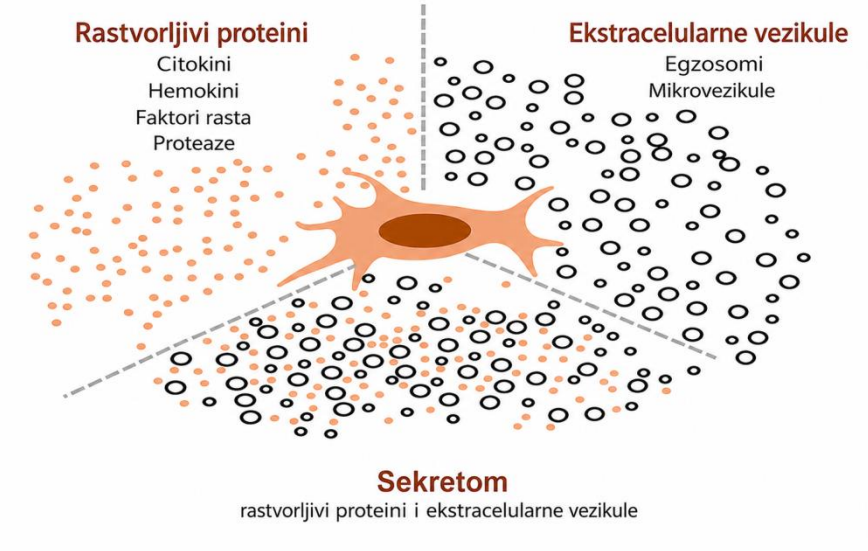
Na osnovu svih razmotrenih karatkteristika, prednosti i nedostataka MSCs u potencijalnom terapijskom lečenju neurodgenerativnih oboljenja, logičan nastavak predstavlja razumevanje derivata, već pomenutih ćelija(28,29,30).Najsavremenija istraživanja sve jasije ukazuju da terapijski potencijal MSCs ne zavisi samo od njihovih mogućnosti diferencijacije ili dugotrajnog opstanka u tkivu, već svojstvo koje ih izdvaja od drugih tipova ćelija, je emitovanje signalnih molekula u svoje okruženje. Zbog velikih, svojevrsnih prednosti signalnih molekula poreklom od MSCs, regenerativna medicina se u zadnjih par godina okrenula biološkim proizvodima, odnosno MSCs derivatima (23,24,31).

Opšta definicija MSCs derivata bi glasila da su one skup biološki aktivnih molekula i subćelijskih struktura, koje MSCs proizvode i oslobađaju kao deo svoje normalne fiziološke funkcije. Metaforički moglo bi se uporediti da ove ćelije podsećaju na senzore tkivnog oštećenja. Ovu mogućnost karakteriše da ćelije mogu da prepoznaju promene u svom mikrookruženju kao što su inflamacija, hipoksija, oksidativni stres ili oštećenje neurona, i na osnovu tih signala prilagođavaju svoj sekretorni odgovor (31). Molekuli koje MSCs oslobađaju su upravo derivati o kojima govorim, oni mogu da utiču na preživljavanje, funkciju i ponašanje okolnih ćelija (31).

Jedna od uočljivijih razlika između samih MSCs i njihovih derivta je ta što derivati nemaju mogućnost proliferacije, migracije ili diferencijacije. A sličnost sa MSCs je što zadržavaju bitnu funkcionalnu osobinu MSCstj. sposobnost modulacije bioloških procesa u oštećenom tkivu, koja je od terapijske važnosti za neurodegenerativna oboljenja (30,32). Obzirom da su već navedena različita ograničenja u terapijskom delovanju MSCs, kao što je prisustvo KMB ili složensot građe mozga, ovakav način delovanja derivata MSCs je od važnosti za CNS (9). Već je poznato parakrino delovanje MSCs, ali to svojsvo je karakteristično i za derivate MSCs. MSCs ne mogu da zamene oštećene neurone ili glijalne ćelije, ali mogu da utiču da na postojeće žive ćelije i da menjaju njihovo okruženje u kojima funkcionišu. One ovo ostvaruju uz pomoć svojih derivata, tako što ublažavaju inflamaciju, smanjuju oksidativni stres, utiču na glijalnu aktivaciju, poboljšaju preživljavanje neurona i doprinesu stabilizaciji narušenog mikrookruženja mozga (10,26,29).Popularni terapijski pristupi,inače ciljaju jedan mehanizam dejstva, koji uzrokuje patologiju, dok ovakav koordinisan i širi način delovanja predstavlja veliku prednost u odnosu njih. Vrlo je važno spomenuti da derivati MSCs nisu uvek isti(7,10,14,31).Njihov sastav zavisi od više okolnosti, kao što je poreklo samih MSCs uslovi u kakvima su uzgajane, kao i signala koji do njih stižu iz okruženja. Ovo se može prevesti da MSCs prilagođavaju i adaptiraju odgovor, na postjeće okruženje, odnosno potrebama oštećenog tkiva i taj odgovor šalju drugim ćelijama(7,10,14,31).Ovo se može sagledati kao upadljiva prednost u

neurodegenrativnim oboljenjima, koja inače karaterišu zapaljenje, nakupljanje toksičnih proteina i poremećaji metabolizma, jer omogućava ciljano dejstvo, ali detaljnije o ovome možete pročitati kasnije u nastavku teksta (7,10,14,31).

3.1. Sekretom MSCs, ekstracelularne vezikule i egzosomi i kondicionirani medijum



Slika 3. Šematski prikaz MSCs derivata. Modifikovano prema:Driscoll J, Patel T. *The mesenchymal stem cell secretome as an acellular regenerative therapy for liver disease*. J Gastroenterol. (33).

Sekretom MSCs čine rastvorljivi proteine (citokine, hemokine, faktore rasta i proteaze) i ekstracelularne vezikule (egzosomi i mikrovezikule), koji učestvuju u međučelijskoj komunikaciji i regeneraciji tkiva (Slika 3.).

Sekretom MSCs (MSCs-Sec) obuhvata sve rastvorljive molekule koje ove ćelije aktivno izlučuju u ekstracelularni prostor. On uključuje širok spektar proteina, faktora rasta, citokina, hemokina, enzima i regulatornih molekula koji zajedno učestvuju u međučelijskoj komunikaciji (26,29). Ono što razlikuje sekretom od klasičnih signalnih molekula je to što predsavlja komleksnu mrežu faktora koji su u sinhronicitetu, a to znači da ni jedan biološki molekul samostalno ne daje kompletan efekat, već se kompletan efekat postiže zajedničkim dejstvom svih molekula, što ukazuje na njihovu kompleksnost (31). Sekretom MSCs je izrazito senzitivan na promene okruženja, tako da, kada se nađe u uslovima inflamacije, hipoksije ili metaboličkog stresa, MSCs pormene profil molekula koji sekretuju

i tada sekretom MSCs postaje funkcionalni pokazatelj stanja ćelije ili tkiva u određenom trenutku. Na osnovu svega napisanog, može se reći da sekretom presavlja dinamički biološki odgovor MSCs, na postojeće stanje tkiva ili ćelije (26,31).

Ekstracelularne vezikule (MSCs-EVs) se definišu kao čestice ovičene membranom koje MSCs aktivno oslobađaju u svoje okruženje i imaju funkciju u ćelijskoj komunikaciji. Ćelijska komunikacija se odvija, tako što nosači bioloških informacija, koje u ovom slučaju predstavljaju ekstracelularne vezikule, omogućavjaju interakciju između ćelija putem molekula koje nose, na izuzetno precizan način (17).Egzosomi predstavljaju najmanju grupu EVs, sa prečnikom od približno 30 do 150 nm. Njihov nastank se dešava tokom endozomskog sistema, koji predstavlja unutrašnju mrežu ćelije koja ima ključnu ulogu u prijemu, raspodeli i razgradnji materija. Ovaj proces se zasniva na tome da ćelija preuzima materije iz spoljašnje sredine procesom endocitoze i obrađuje molekule koje dobija iz endoplazmatskog retikuluma i Goldžijevog aparata. Ćelije egzosoma se oslobađju u spoljašnju sredinu, nakon što se vezikule fuzionišu sa ćelijskom membranom i na taj način formiraju egzosome (31,32). Osnovna njihova funkcija je prenos biološkog sadržaja, uključujući proteine, lipide i nukleinske kiseline. Sadržaj koji MSCs prenose nije nasumičan, već je selektivni odabir molekula koji formiraju egzosome, ćime se postiže ciljana ćelijska komunikacija (29,32). Ono što ih razlikuje od slobodnih rastvorljivih molekula je stabilnost i otpornost na degradaciju u ekstracelularnom prostoru što egzosomi poseduju dvoslojnu fosfolipidnu membranu. Još jedna prednost posedovanja lipidne membrane je produžena aktivnost i mogućnost da dosegnu dalje u tkivo (31).

Kondicionirani medijum MSCs (MSCs-CM)predstavlja kultivacioni medijum u kome su MSCs uzgajane tokom određenog vremena i koji sadrži sve bioaktivne produkte koje su ćelije izlučile u tom periodu. Njegov sastav je sačinjen od rastvorljivih komponenti sekretoma i EVs, tako da sadrži sve komponente koje zajedno imaju kompletnu parakrinu aktivnost MSCs (26,31). Ono što MSCs-CM čini drugačijim od pojedinih vrsta derivata MSCs je to što objedinjuje različite signalne molekule u njihovom prirodnom odnosu i koncentracijama, bez prisustva samih ćelija (26). Njegov sastav nije uniforman, jer zavisi od mnoštvo faktora, kao što su trajanje kultivacije, gustinu ćelija i uslove u kojima su MSCs gajene. Na osnovu već rečenog, zaključuje se da je MSCs-CM dinamični proizvod MSCs, koji održava njihovo funkcionalno stanje (29).

3.2. Mehanizmi delovanja MSCs derivata na patološke mehanizme koji se nalaze u osnovi neurodegenerativnih oboljenja

Neurodgenerativna oboljenja međusobno se znatno mogu razlikovati po kliničkoj manifestaciji, međutim u osnovi oboljenja su dosta slični patofiziolološki mehanizmi. Najdominantnije zastupljeni mehanzimi su agregacija patoloških proteina, poremećaj proteostaze, oksidativni i metabolički stres, mitohondrijalna disfunkcija, ekscitotoksičnost, hronična neuroinflamacija, disfunkcija KMB i promene u mikrookruženju CNS-a, koji su već detaljno objašnjeni (6,9,10). Zbog svoje složenosti i međusobne povezanosti patofizioloških uzroka oboljenja, neurodgenerativne bolesti nemaju jedinstvenu i efikasnu terapiju. Derivati MSCs, uključujući MSCs-Sec, EVs, MSCs-Exo, MSCs-CM predstavljaju funkcionalni nastavak parakrinog delovanja MSCs i mogu da modulišu više patoloških procesa u isto vreme, zbog čega se uzimaju u obzir kao potencijalna terapija ili deo terapije neurodgenerativnih bolesti (31,32,34). U prethodnim poglavljima pisano je o nedostacima trenutno aktuelnih simptomackih terapija, koje se koriste u lečenju već pomenutih oboljenja, tako da je potraga za adekvatnom i funkcionalnom terapijom još uvek u toku, a derivati MSCs samostalno ili zajedno sa MSCs predsavljaju potencijalnog kandidata (8,9,10,14,31).U nastavku teksta će detaljno biti objašnjen uticaj derivata na patološke mehanizme zasebno.

Akumulacija pogrešno savijenih proteina

Jedan od centralnih uzroka neurodegeneracije u AB i drugih neurodegenerativnih oboljenja jeste akumulacija pogrešno savijenih proteina, koji prati poremećaj proteostaze, odnosno smanjena sposobnost ćelije da održi balans između sinteze, savijanja i uklanjanja proteina (6,7).Obzirom da su neuronske ćelije dugovečne i imaju ograničenu regenerativnu sposobnost, a ujedno izrazito osetljive na opterećenja toksičnim proteinima, otkazivanje sistema za uklanjanje tokičnih proteina, poput autofagije i ubiquitin–proteasomskog sistema, za njih predstavlja veliki stres i progresino vodi u smrt (7,8). Upravo kada dođe do ovakvih poremećaja može se uvideti potencijal derivata MSCs, jer MSCs-Sec, MSCs-EVs/MSC-Exo deluju kao modulatori ćelijskih sistema za kontrolu kvaliteta proteina, omogućavajući neuronima da se efikasnije izbore sa patološkim opterećenjem. Ovaj proces se zansiva na tome da derivati MSCs aktiviraju autofagiju u neuronskim ćelijama i time povećavaju ekspresiju ključnih autofagijskih molekula kao što su Beclin-1 i LC3-II(31,35). Kada dođe do aktivacije Beclin-1 je ključni inicijator autofagije, koji su aktivirali derivati MSCs povećavajući njegovu ekspresiju, dolazi do formiranja autofagijskog kompleksa. Ovo znači da ćelija počinje da formira autofagozome i metaforički rečeno, skuplja pogrešno savijene proteine(8,9,29). Ovo je naročito važno u AB (Aβ,

tau), ali i u PB (α-sinuklein) i ALS (TDP-43). Dok, aktivacijom LC3-II koji je marker „aktivne autofagije“, proces teče na sledeći način: LC3-I se konvertuje u LC3-II, zatim se LC3-II se ugrađuje u membranu autofagozoma. Derivati MSCs u ovom slučaju, povećavaju nivo LC3-II i time autofagozomi nastaju, sazrevaju i spajaju se sa lizozomima. U isto vreme derivati MSCs inhibiraju mTOR signalni put, koji u patološkim uslovima blokira procese razgradnje proteina (8,9,29).Ovo se dešava na više načina aktivacijom AMPK (senzor energetskog stresa), modulacijom PI3K/Akt ravnoteže i smanjenjem inflamatornih i oksidativnih signala koji drže mTOR aktivnim (29,32). Odnosno, kada mTOR aktivnost se smanji ćelija će moći da uključi autofagiju (8,9,29).Ovim mehanizmom je ubrzano uklanjanje proteinskih agregata i automatski utiče na osnovni uzrok neurodegeneracije u AB i drugih neurodegenerativnih oboljenja. U AB, derivati MSCs regulišu amiloidnu homeostazu. To se odigrava tako što faktori koji su prisutni u MSCs-Sec pospešuju aktivnost enzima neprilizina i insulin-degrading enzima, koji fiziološki učestvuju u razgradnji Aβ peptide(36).Na ovaj način se umanjuje koncentracija toksičnih Aβ oligomera u tkivu mozga, čime se direktno smanjuje sinaptotoksičnost i usporava kognitivno propadanje (8,9,12,29). U isto vrme derivati MSCs utiču i na tau patologiju, naročito onu koja se javlja u AB, tako što aktiviraju PI3K/Akt signalni put u neuronima i time dolazi do inhibicije GSK-3β i CDK5, glavnih kinaza odgovornih za hiperfosforilaciju tau proteina (36,37). Posledično, tau zadržava sposobnost vezivanja za mikrotubule, stabilizuje se aksonalni transport i smanjuje intracelularni stres (8,9,10,34). Naglasila bih da ovaj efekat se ne tiče samo jednog oboljenja već je generalni odgovor na proteinopatije, što predstavlja prednost derivata, jer može da utiče na više patoloških procesa istovremeno obnavljajući narušenu proteostazu. Suština ove prednosti je što utiče na uzrok, a ne samo na simptome neurodegenerativnih oboljenja (8,9,10,34).

Oksidativni stres i mitohondrijalna disfunkcija

U AB, oksidativni stres i mitohondrijalna disfunkcija prestavljaju glavne uzročnike oštećenja neurona. Ovi patofiziološki mehanizmi su povezani sa akumulacijom Aβ peptida i patološkim promenama tau proteina, koji deluju tako što jedan pojačava drugi i formiraju začarani krug. Iz svega ovoga proizilazi progresivan gubitak sinapsi i neurona, odnosno, kognitivno propadanje, karakteristično za ovu bolest (8,9,10). Prvi važan efekat derivata MSCs jeste smanjenje oksidativnog stresa u neuronskom mikrookruženju, a to se postiže aktivacijom enzima koji neutrališe ROS, aktivacijom zaštitnih signalnih puteva poput Nrf2/ARE. Na ovaj način se smanjuje ukupno oksidativno opterećenje u ćelijama (36,37,38). Na ovaj način su zaštićene mitohondrijalne membrane i komponente elektrontransportnog lanca, čime se sprečava dalje pogršanje energetske disfunkcije (8,10).Derivati MSCs smanjuju inflamatorni stres, što predstavlja još jedan indirektni efekat na disfunkciju mitohondrija (36,37). Inflamatorni citokinini, koji su inače povišeni kod AB, potvrđeno narušavaju mitohondrijalni

membranski potencijal i pojačavaju produkciju ROS. Kada se smanji njihova produkcija, dolazi do stabilizacije mitohondrijalnog membranskog potencijala, očuvanju Ca^{2+} homeostaze i efikasnost oksidativne fosforilacije je veća. Zahvaljujući svemu ovome, neuroni postaju sposobniji da proizvode dovoljne količine ATP-a neophodne za održavanje sinaptičke funkcije (8,9,10). Iako derivati MSCs ne mogu direktno ukloniti već postojeće amiloidne plakove ili neurofibrilarna klupka, njihova prednost je što formiraju adekvatno intracelularno i ekstracelularno okruženje koje manjuje napredovanje dalje neurodegeneracije (32,36). Što se tiče sinapsi, one bivaju zaštićene, zbog stabilizacije mitohondrijalne funkcije i smanjenja oksidativnog i inflamatornog stresa. Gubitak sinapsi je usko povezan sa kognitivnim propadanjem u AB, tako da, već pomenuti efekti derivata MSCs su od velike važnosti u usporavanju progresije bolesti i očuvanju kognitivnih funkcija (8,9,10).

Što se tiče uticaja derivata MSCs na mitohondrijalnu disfunkcju i oksidativni stres kodPBpromećeno je sledeće: u neuronu je stanju povećane produkcije ROS (superoksid, H_2O_2, hidroksilni radikali), oštećenje mitohondrija i poremećen u elektron-transportni lanac u PB. Poznato je da ROS oštećuju lipide membrane, oksiduju proteine, oštećuju mitohondrijalnu DNK i dodatno pogoršavaju mitohondrijalnu disfunkciju, čime se stvara začarani krug. Derivati MSCs u ovom slučaju imaju protektivno dejstvo, tako što aktiviraju unutrašnje zaštitne sisteme neurona (8,10,37,38). A ta protektivna funkcija se postiže aktivacijom Nrf2/ARE signalnog puta,koji je glavni zaštitni mehanizam, kao što je slučaj i u AB (38).U normalnim uslovima Nrf2 je vezan u citoplazmi i neaktivan, dok pod dejstvom signala iz derivata MSCs Nrf2 se oslobađa, zatim ulazi u jedro i vezuje se za ARE (antioxidant response elements) na DNK, čime se pojačava ekspresija SOD1 i SOD2, katalaze, glutation-peroksidaze, enzima za sintezu glutationa (GSH)(38). Bitnost svega ovoga za neuron je u tome što superoksid ($O_2^{\bullet -}$) se pretvara u H_2O_2,a H_2O_2 se razlaže na vodu i kiseonik i time sprečava nastanak najtoksičnijih radikala (•OH). Kasnije, nivo ROS opada, lipidna peroksidacija se smanjuje i membrane mitohondrija ostaju stabilne. I usporava se dalji tok neurodegeneracije (38). Aktivacijom Nrf2/ARE signalnog puta u AB posredovanjem derivata MSCs, primećen je sličan efekat, odnosno usporavanje daljeg toka bolesti (29,32).

Kod ALS, oksidativni stres i mitohondrijalna disfunkcija izuzetno oštećuju motorne neurone. Motorni neuroni imaju dosta duge aksone i samim tim, velike energetske potrebe. Mali poremećaji u radu mitohondrija su kardinalni za funkcionisanje neurona(7,10).U ALS često dolazi do poremećaja u regulaciji kalcijuma i ekscitotoksičnosti, što predtavlja dodatno oštećenje za mitohondrije i pospešuje produkciju ROS(7,10).Uticaj derivata MSCs u ovakvim uslovima je pozitivan, jer smanjuju oksidativna oštećenja, poboljšavaju funkciju mitohondrija i omogućavaju neuronima da efikasnije proizvode energiju,I time stabilizuju stanje neurona. Derivati MSCssmanjuju ROS, tako što pojačavaju antioksidativne sisteme neurona (SOD, katalaza, GPx) i aktiviraju Nrf2/ARE signalni put, što za

posledicu ima smanjenu količinu superoksida, smanjeno oštećenja mitohondrijalnih proteina i lipida i mitohondrije ponovo mogu normalno da proizvode ATP(37,38). U ALS višak Ca^{2+} destabilizuje mitohondrijalni membranski potencijal ($\Delta\Psi m$), dok derivati MSCs smanjuju oksidativna oštećenja membrane, stabilizuju Ca^{2+} homeostazu i sprečavaju otvaranje mitohondrijalne permeabilne tranzicione pore (mPTP)(7,10,38).Posledično sprečava se produkcija citohroma c i ne aktivira se kaskada apoptoze, čime mitohondrije ostaju "zatvorene" i funkcionalne. Još jedan pozitivan uticaj je poboljšanje energetske efikasnosti neurona. Kada ROS opadne, $\Delta\Psi m$ se stabilizuje i mitohondrije nisu preopterećene Ca^{2+}, neuron proizvodi više ATP-a, bolje održava jonske gradijente i postaje otporniji na ekscitotoksične udare, što je sve od velike važnosti za motorne neurone (7,10). Ovakvi efekti su slični kao kod AB, gde derivati MSCs takođe deluju ublažavanjem oksidativnog stresa i očuvanje mitohondrijalne funkcije, smanjenjem ROS (36,38).

U HB mitohondrijalna disfunkcija posledica je delovanja mutiranog mHTT, koji direktno oštećuje mitohondrije, remeti transkripciju gena za mitohondrijalne proteine. Pozitivan uticaj derivata MSCs na HB je što smanjuju oksidativni stres, tako što derivati MSCs aktiviraju endogene antioksidativne puteve u neuronima, pojačavaju Nrf2 signalizaciju i smanjuju lipidnu peroksidaciju i oksidativna oštećenja mitohondrija. Ovo je bitno, jer mitohondrija ne može da nastane u jakom oksidativnom okruženju. Drugi pozitivan uticaj deivata MSCs na ovo oboljenje je što indirektno reaktiviraju PGC-1α, koja je kod ovog oboljenja smanjena, zbog direktnog dejstva mHTT. Ovo se odigrava, tako što derivati MSCs potstiču signalne puteve, kao što su Akt/CREB i AMPK, koji aktiviraju ekspresiju gena uključenih u kspresiju gena uključenih u stvaranje novih mitohondrija i oksidativnu fosforilaciju. Posledica svega navedenog je da neuroni počinju da stvaraju nove i funkcionalne mitohondrije i povećava se kapacitet za proizvodnju ATP-a (6,7,10). I treća prednost uticaja derivta MSCs je povećanje energetske efikasnosti neurona strijatuma, jer derivati MSCs smanjuju ROS, povećaju broj funkcionalnih mitohondrija i stabilizuju mitohondrijalni membranski potencijal, čime neuron duže održava sinaptičku aktivnost, sporije ulazi u energetski kolaps, postaje otporniji na mHTT-indukovane toksične signale (6,7,10).Slično kao kod AB, derivati MSCs i u HB ispoljavaju protektivni efekat smanjenjem oksidativnog stresa, poboljšanjem mitohondrijalne funkcije i povećanjem energetske efikasnosti neurona (10,12,36).

Kod MS, mitohondrijalna disfunkcija nije primarni uzrok bolesti, ali kada bolest uđe u hroničan tok, onda dobija na važnosti. Zbog dugotrajne inflamacije i demijelinizacije, aksoni iziskuju veću količinu energije , jer su pod hroničnim stresom (10,14). U isto vreme, oksidativni stres dodatno oštećuje mitohondrije i doprinosi aksonskom propadanju. Pozitivan uticaj derivata MSCs u ovom oboljenju je što doprinosi smanjenju inflamacije i smanjenju oksidativnog stresa u nervnom tkivu (10,14). Derivati MSCs deluju imunomodulatorno i antiinflamatorno, tako što smanjuju aktivaciju mikroglije

i infiltriranih imunskih ćelija, utišavaju lučenje proinflamatornih citokina i podstiču antiinflamatorno okruženje u CNS-u (32). Kada dođe do smanjenja inflamacije, smanjuje se produkcija ROS i NO i prestaje konstantno oštećenje mitohondrija. Ovo znači da mitohondrijalne membrane više nisu izložene kontinuiranom oksidativnom napadu, da stabilizuje se mitohondrijalni membranski potencijal, poboljšava se efikasnost oksidativne fosforilacije, odnosno kao kranji ishod mitohondrije mogu konačno ponovo da proizvode dovoljne količine ATP-a za potrebe neurona i aksona (10,14). Kao i kod AB, efekat derivata MSCs u MS je baziran na smanjenju oksidativnog stresa, očuvanju mitohondrijalne funkcije i poboljšanju energetske efikasnosti neurona (10,32).

Ekscitotoksičnost i poremećaj kalcijumske homoestaze

Još jedan od patoloških mehanizama koji uzrokuje neurodegenrativne bolesti o kojima smo već govorili je ekscitotoksičnost i poremećaj kalcijumske homoestaze. Ovaj proces se javlja u više neurodegenerativnih oboljenja. Ekscitotoksičnost i poremećaj kalcijumske homeostaze imaju značajnu uloguu AB,PB, ALS, dok u MS predstavljaju sekundarni, ali klinički relevantan mehanizam oštećenja neurona (6,7,8,9). Bez obzira što se ovaj patološki mehanizam javlja u svim ovim oboljenjima razlikuje ih što njegovi uzroci i posledice zavise od molekulskog i ćelijskog konteksta (6,7). Uticaj derivati MSCs, uključujući MSCs-Sec i MSCs-EVs na ove patofiziološke procese, koji uzroku neurodegenraciju je uglavnom indirektan, odnosno, uticaj je zasnovan preko procesa modulacije neuronskog i glijalnog mikrookruženja i ne blokira glutamatnu neurotransmisiju (10,39).Jedan od ključnih terapijskih efekata derivata MSCs jeste povećanje ekspresije i funkcionalnosti glutamatnih transportera EAAT2/GLT-1 u astrocitima. Na ovaj način se uspešno uklanja višak glutamate iz sinaptičke pukotine, što smanjuje produženu stimulaciju NMDA i AMPA receptora i stvara ograničenje za prekomerni ulazak Ca^{2+} u neuron(10,39,40). Ovaj mehanizam je pogotovo važan za ALS, ali ima i terapijski značaj za AB i PB. Još jedna prednost derivata je što omogućavaju stabilnost glutamatnih receptora na postsinaptičkoj membrani. Dodatno ograničavanje nekontrolisanog ulazaka Ca^{2+} i smanjuje aktivacija toksičnih signalnih puteva u neuronima se dograva tako što derivati MSCs regulišu fosforilaciju pojedinih NMDA i AMPA receptorai time smanjuju njihovu patološku preosetljivost, pogotovo kada se nađu u inflamatorno okruženju karakterističnom za naurodegenerativna oboljenja (9,10,41). Prednost derivata utiču pozitivno na očuvanje kalcijumske komoestaze, tako što smnjuju oksidativni i inflamatorni stres. Dokazano je da reaktivne ROS i proinflamatorni citokinini povećavaju propustljivost NMDA receptora za Ca^{2+} i utiču negativno na funkciju mitohondrija. Derivati MSCs smanjenjem ovih faktora utiču indirektno na stabilizaciju koncentracije Ca^{2+} unutar ćelije, očuvavaju funkciju mitohondrija (8,10,38). Važna prednost ovakvog delovanja je uspešno

smanjenje patološke ekscitotoksičnosti bez potpunog blokiranja fiziološke glutamatne signalizacije, što predstavlja prednost u odnosu na farmakološki izbor u obliku NMDA antagonista (9,10,39,41).

Hronična neuroinflamacija

Hroničan oblik neuroinflamacije je jedan od vodećih patofizioloških mehanizama, koji utiče na razvoj i progresiju neurodegenerativnih oboljenja. Za razliku od akutne inflamacije, koja ima zaštitnu ulogu, hroničan oblik je izuzetno štetan, jer uzrokuje trajno oštećenje nervnog tkiva i formira mikrookruženje adekvatno za dalju neurodegeneraciju (8,9).Uticaj derivata MSCs je imunomodulatoran ima ciljano dejstvo na centralne mehanizme neuroinflamacije (29,32). Njihovo dejstvo bazirano je na istovremenom uticaju više komponenti inflamacije, a ne na pojedinačnim faktorima (10). Jedan od najvažnijih efekata derivata je preusmeravanje mikroglije iz F1 u F2 fenotip, koji predzavlja antinflamatorni i reperatativni fenotip. Iz ovog procesa proizilazi smanjenje neurotoksičnih medijatora i pojačava fagocitoza patoloških proteina (8,10,29). Ovaj proces je povezan sa inhibicijom NF-κB signalnog puta i modulacijom STAT3 signalizacije, što za posledicu ima smanjenje ekspresije proinflamatornog gena,a time i proinflamatornog faktora i podsticanje proizvodnje antiinflamatornoih faktora (10,29). Derivati MSCs onemogućavaju prelazak astrocita u toksičan A1 fenotip, a podstiču konverziju u A2 fenotip, koji ima pozitivan uticaj nasinapse i neuralne funkcije (20). Smanjenjem koncentracije TNF-α, IL-1α i komponente komplementa C1q u CNS-u, posledično izaziva prekid u komunikaciji između mikrookruženja CNS-a imikroglije i astrocita, koji održavaju inflamaciju (8,20). Kod MS, derivati MSCs utiču na adaptivni imuni odgovor, tako što smanjuju aktivaciju Th1 i Th17 limfocita i povećavaju broj regulatornih T-ćelija, rezultirajući smanjem autoimunskog odgovora, kao sastavnog dela inflamacije u ovom oboljenju (10,14). Vodeći pozitivni efekat derivata MSCs na neuroinflamaciju je stabilizacija mikrookruženja i usporavanje progresije samih oboljenja (6,7,10).

Disfunkcija KMB

Disunkcija KMB prisutna u više neurodegenerativnih oboljenja, a jedan je od dominantnih uzroka AB, ali iMS, međutim sve ćešće se javlja kao sekundarni uzrok PB i ALS-a (7,8,9).Pozitivan efekat derivata MSCs na oštećenje KMB ogleda se u stabilizaciji i obnovi funkcije KMB, delujući prvenstveno kroz antiinflamatorne i endotelno-zaštitne mehanizme (10,29). Potencijal derivata MSCs se još ogleda u inhibiciji NF-κB signalizacije u endotelijalnim ćelijama, što dovodi do smanjenja ekspresije proinflamatornih citokina i MMP-9, čime se sprečava dalja degradacija tight-junction proteina (8,9,27). Kada dođe do smanjenja inflamatornog pritiska, endotelijalne ćelije opet imaju

tendenciju uspostavljanja stabilnih međućelijskih veza (42). Derivati MSCs mogu direktno uticati na endotelne ćelije aktivacijom PI3K/Akt signalnog puta, koji podstiče sintezu i membransku lokalizaciju okludina, klaudin-5 i ZO-1(9,10). Ovaj efekat je dodatno pojačan smanjenjem aktivnosti metaloproteinaza i povećanjem ekspresije njihovih prirodnih inhibitora (TIMP-1 i TIMP-2), rezultirajući dugotrajnijnom stabilizacijom KMB (9,27). Rezmirajući prednosti derivata MSCs, može se zaključiti da njihov uticaj se ogleda u funkcionalnoj reparaciji, jer istovremeno utiču na inflamaciju, endotelnu stabilnost i mikrookruženje CNS-a (10,29). Iz ovoga proizilazi smanjen ulazak štetnih molekula iz periferije, ograničena inflamacija i neuroni su indirektno zaštićeni od daljeg oštećenja u različitim neurodegenerativnim oboljenjima (6,7,10).

Sinaptička difunkcija

Sinaptička disfunkcija predstavlja jedan od najranijih i najznačajnijih patofizioloških mehanizama, koji uzrokuju neurodegenerativne procese i uglavnom se dešavaju pre bilo kakvih vidljivih gubitaka neurona (43). Sinaptička disfunkcija predstavlja poremećaje koji utiču na funkciju i strukturu sinapsi, što uključuje gubitak dendritskih bodlji, promene u sastavu postsinaptičkih receptora i smanjenu sinaptičku plastičnost (43,44). Ovaj mehanizam se izraženije javlja kod AB, čak je veći uzročnik kognitivnog propadanja u odnosu na sam broj amiloidnih plakova ili neurofibrilarnih klupaka (8,44).Kakav uticaj drivati MSCs imaju na sinaptičku difunkciju kod već navedenih oboljenja?Njihov potencijal se manifestuje kroz ublažavanje sinaptičke disfunkcije, stabilizacijom neuronske signalizacije i modulacijom sinaptičkog mikrooktuženja (10,29). Smanjenje inflamacije u sinaptičkom prostoru, sprečava inflamacijom indukovano povlačenje NMDA i AMPA receptora sa ćelijske membrane i ovo predstavlja jedan od mnogih pozitivnih uticaja derivata MSCs na patološki mehanizam o kojem je ovde reč (29,43). Iz ovoga proističe da kada dođe do smanjenja proinflamatornih citokina, normalizuje se postsinaptička signalizacija i očuvanje sinaptičke plastičnosti (20,43). Druga prednost derivata MSCs je stabilizacija glutamatne homeostaze, na indirektan način, smanjujući ekscitotoksične uslove iz kojih proizilazi sinaptičko oštećenje (43,45). Kada se postigne sačuvana mitohondrijalna funkcija u sinaptičkim završecima, dolazi do adekvatne proizvodnje ATP-a neophodnog za održavanje sinaptičke transmisije, takođe uz uticaj derivata MSCs (22,43). Stabilizacijom energetskog statusa sinapsi omogućen je normalan rad jonskih pumpi i održavanje postsinaptičkog potencijala (22). Ovakav uticaj je izuzetno pozitivan na tok AB, jer doprinosi očuvanju sinaptičke gustine i usporavanju gubitka kognitivnih funkcija (8,10,36). Kod PBu odnosu na AB, pozitivan ishod uticaja derivata MSCs je bolja regulacija neurotransmisije i usporavanje propadanja funkcija neuronskih mreža (7,37). U ALS iz stabilizacije sinaptičke funkcije proizilazi usporavanje gubitka motorne kontrole, pogotovo ako je sinaptička funkcija očuvana na nivou neuromišićne spojnice (46). Način delovanja

derivata MSCs se zasaniva na stvaranju uslova u kojima sve sinapse, bez ikakve selekcije bivaju očuvane funkcionalno i strukturno, uprkos prisutnim patološkim procesima(10,29).

Poremećaj u mikrookruženja CNS-a

Mikrookruženje CNS-aposeduje uslove u kojima neuron i glijalne ćelije funkcionišu, kao i balans citokinina i hemokina, kada je ovo stanje narušeno, značajna je uloga MSCs derivata, ali na koji način? Derivati MSCs smanjuju lučenja proinflamatornih citokina i preusmeravaju mikroglije i astrocite ka manje toksičnim fenotipovima, čime se prekida hronični inflamatorni signal, koji održava nepovoljno mikrookruženje (8,9,10,29). Smanjenje inflamacije dovodi do smanjenja oksidativnog stresa i stabilizacije metaboličkih uslova u kojima neuroni funkcionišu, što je najznačajnije u terapiji AB, al i PB i ALS, jer su neuroni izuzetno energetski osetljivi (8,10,14). Derivati MSCs imaju pozitivan uticaj i na stabilizaciju ekstracelularnog matriksa i neurovaskularne jedinice, čime se posredno poboljšava sinaptičko i metaboličko okruženje, kao i integritet KMB, naročito u AB i MS (8,9,10,47).Zaključak je da derivati MSCs pozitivno utiču na stanje mikrookruženja CNS-a i na taj način omogućavaju usporavanje progresije bolesti i smanjeno oštećenje neurona (12,14).

3.3. Prednosti derivata MSCs u odnosu na ćelijsku terapiju MSCs

Derivati MSCs, odnosno,sekretom mezenhimskih matičnih/ ćelija (engl. *Mesenchymal stem cell secretome*, MSCs-Sec), ekstracelularne vezikule poreklom od mezenhimskih matičnih ćelija (engl. *Mesenchymal stem cell extracellular vesicles*, MSCs-EVs), egzosomi poreklom od mezenhimskih matičnih ćelija (engl. *Mesenchymal stem cell exosomes*, MSCs-Exo),kondicionirani medijum mezenhimskih matičnih ćelija (engl. *Mesenchymal stem cell-conditioned medium*, MSCs-CM),su savremen ogranak regenerativne medicine, koji se koristi u regenerativnim terapijama i bazira se na biološkim signalima MSCs, bez korišćenja živih ćelija (10,14,32). Ovo predsavlja korišćenje produkata samih MSCs, koji one prirodno luče u ekstracelularni prostor i na taj način utiču na okolne ćelije. Prednost ovakvog pristupa je zadržavanje terapijskog potencijala MSCs, a istovremeno gubitak ograničenja, koja su u vezi sa ćelijskom terapijom (10,14).

Bezbednost je prva osobina derivata MSCs, koja ima prednost u odnodu na ćelijsku terapiju. Derivati MSCs nemaju mogućnost deobe, nekontrolisane migracije ili mogućnosti da dugotrajno ostanu u tkivu, što otklanja rizik od nepredvidivog ponašanja ćelija nakon aplikacije, za razliku od MSCs (25,26,27). Dokazano je da u slučaju ćelijskih terapija MSCs imaju tendenciju da ostanu zarobljene

u perifernim organima, pogotovo u plućima, što u slučaju terapije neurodgenerativnih oboljenja predtavlja ozbiljan nedostatak, zbog nemogućnosti da dovoljan broj ćelija stigne do CNS-a i može potencijalno izazvati neželjene posledice(4,16,27). Pogodnost za terapijsku primenu kod neurodegenrativnih oboljenja je to što su acelularni terapijski materjal i zbog toga se mogu koristiti za ponavljanu i dugoročnu primenu (10,14).

Druga prednost derivata MSCs u odnosu na same MSCs je što imaju bolju standardizaciju i lakše im je kontrolisati kvalitet. Terapijski efekat kod MSCs je varijabilan i uglavnom zavisi od izvora ćelija, starosti donora, broja pasaža i uslova u kojima su gajene(25,26). Nasuprot tome, detaljna analiza derivata MSCs pre same primene je itekako moguća, kao što je sadžaj proteina, RNK, veličina vezikula, zbog čega je moguće formirati stabilnu terapisjku seriju (26,32,34). Obzirom da je proces evaluacije komplikovaniji i put do primene u praksi težak, ova karakteristika je od važnosti, jer terapija sa jasno definisanim sastavom ima veću prolaznost u ovom slučaju (26,27).

Sledeća značajna prednost, koja je izdvojena je imunološka neutralnost u odnosu na žive ćelije. MSCs važe za ćelije sa niskim imunogenim potencijalom, ali ekspresija imunoloških molekula je promenljiva u zavisnosti od okruženja u kome se mogu naći, pogotovo može doći do veće ekspresije imunoloških molekula, ako se nađu u uslovima gde je prisutna jaka inflamacija, kao što je u neurodegenrativnim oboljenjima (25,27). Zbog svojstva derivata MSCs, da funkcionišu kao nosioci bioloških informacija, kao što su citokinini, faktori rasta ili mikroRNK, a da u isto vreme ne učestvuju u imunološkim interakcijama, što nije karakteristika ćelija, sve ih ovo čini dosta stabilnijim predvidljivijim za terapiju (10,14,34).

Karakteristika derivata MSCs u kontekstu CNS-a je bolja prilagodljivost na biološke barijere, poput KMB. Dimenzije MSCs-EVs/MSCs-Exo su znatno male, pogotovo ako ih poredimo sa ćelijama MSCs, što im daje prednost u lakšoj interakciji sa endotelom krvno-moždane barijere što omogućava bolju prolaznost terapijskih signala do moždanog tkiva (36,42,48). Dejstvo MSCs derivata u moždanom tkivu je direktno, jer omogućavaju direktniju modulaciju neuronskog mikrookruženja, dok dejstvo MSCs zavisi od indirektnog parakrinog dejstva sa periferije (10,16).

Derivati MSCs poseduju mogućnost preciznijeg usmeravanja terapijskog efekta u odnosu na ćelijsku terapiju. Ova mogućnost se objašnjava sastavom MSCs-Sec i MSCs-EVs, koji ima sposobnost modifikacije u uslovima kulture MSCs, kao što je stanje hipoksije ili izloćenost inflamatornim stimulusima. Ovo svojstvo je prednost pri formiranju terapije sa ciljanim dejstvom (26,32,34). MSCs su često nepredvidive u nepoznatom mikrookruženju, zbog čega je njihova kontrola realnog ponašanja i sekrecije *in vivo* otežana, za razliku od derivata MSCs (4,25).

U kombinovane terapijske strategije bolje uklapanje je derivata MSCs, nego samih MSCs, jer ih je lakše precizno dozirati, koristiti u ponovljenim terapijama i kombinovati sa farmakološkim pristupima, bez rizika, koji inače nose žive ćelije(14,18,26). Derivati su trenutno favoriti u odabiru terapija za neurodegenrativna oboljenja, jer se mogu koristiti dugoročno i mogu delovati kontrolisano na više patoloških mehanizama u isto vreme, na derivate MSCs možemo gledati kao evoluciju MSCs terapije,metaforički rečeno (32,33).

4. Metodologija

4.1. Metodološki okvir

U radu je korišćen pregled literature, uz analizu i upoređivanje podataka iz različitih izvora. Cilj ovakvog načina rada je bio da se na jednom mestu objedine i povežu različita saznja, koja su u vezi sa terapijskim potencijalom MSCs i njihovih derivata u cilju lečenja neurodegenrativnih oboljenja. Razlog zašto je narativni pristup izabaran je raznolikost studija na više nivoa, odnosno po tipovima terapija (žive mezenhimske matične ćelija naspram njihovih derivata), eksperimentalnim modelima i po dizajnu kliničkih ispitivanja.S obzirom na razlike između analiziranih radova, nije bilo moguće sprovesti meta-analizu, pa je akcenat stavljen na kvalitativnu analizu i međusobno poređenje nalaza.

4.2. Pretraživačka strategija

Literatura je pretraživana u sledećim bazama podataka:

1. PubMed/MEDLINE

2. Scopus

3. Web of Science

4. Google Scholar (korišćen u svrhu dopune pronalaženja dodatnih relevantnih radova)

Korišćene kombinacije ključnih reči na engleskom jeziku:

mesenchymal stem cells, MSCs therapy, MSCs-derived exosomes, extracellular vesicles, MSCs secretome, conditioned medium, neurodegenerative diseases, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Huntington's disease, multiple sclerosis.

Ključne reči su kombinovane pomoću logičkih operatora AND i OR, čime su rezultati pretrage preciznije usmereni (na primer: *"mesenchymal stem cells" AND "Alzheimer's disease"* ili *"MSCs exosomes" OR "MSCs extracellular vesicles" AND "Parkinson's disease"*).

U radu su korišćeni radovi iz poslednjih 20 godina, kao i stariji naučno značajni radovi koji su doprineli razvoju terapija zasnovanih na mezenhimskim matičnim ćelijama i njihovim derivatima.

4.3. Kriterijumi uključivanja i isključivanja

Kriterijumi uključivanja

U rad su uključene studije koje:

1. predstavljaju preklinička ispitivanja (*in vitro* i *in vivo* modeli neurodegenerativnih bolesti)

2. predstavljaju klinička ispitivanja terapije mezenhimskim matičnim ćelija ili njihovim derivatima

3. ispituju bezbednost ili/i efikasnost i mehanizme delovanja mezenhimskih matićnih ćelija ili njihovih derivata

4. odnoseći se na sledeća oboljenja: Alchajmerova bolest, Parkinsova bolest, amiotrofična lateralna skleroza, Huntingtonova bolest i multipla skleroza

5. su objavljenje na engleskom jeziku

Kriterijumi isključivanja

Iz analize radova isključeni su:

1. radovi koji se ne odnose na terapiju MSCs ili na njihove derivate

2. studije koje ispituju druge tipove matičnih ćelija, a nemaju jasnu vezu sa MSCs

3. radovi koji ne sačinjava jasan metodološki opis ili ne poseduju podatke o ishodima

4. duplirane publikacije ili radovi koji su dostupni samo u formi sažetaka

4.4. Sistematizacija i analiza podataka

Nakon selekcije, radovi su organizovani prema:

1. vrsti bolesti (Alchajmerova bolest, Parkinsova bolest, amiotrofična lateralna skleroza, Huntingtonova bolest i multipla skleroza)

2. terapijskog pristupa:

- Terapija živim MSCs

- Terapija derivatima MSCs (MSCs-EVs/MSCs-Exo, MSCs-Sec, MSCs-CM)

Iz svakog rada su izdvajani podaci koji se odnose na:

•mehanizme delovanja (npr. imunomodulacija, neuroprotekcija, smanjenje oksidativnog stresa)

- podatke o bezbednosti terapije
- pokazateljeefikasnosti (kognitivni i motorni ishodi, biomarkeri, kliničke skale)
- osnovne karakteristike studije (model bolesti, broj ispitanika, faza kliničkog ispitivanja)

Nakon izdvanja podataka, informacije su precizno analizirane, zatim upoređivane. Cilj je bio da se primate zajednički obrasci delovanja terapije bezirane na MSCs i njihovim derivatima u različitim neurodegenerativnim bolestima, ali ujedno i razlike između terapija baziranih na živim ćelijama i terapijama bez njih ("cell-free" terapije).

4.5. Etički aspekti i značaj za kliničku primenu

Ovaj rad je baziran isključivo na već objavljenim naučnim studijama i ne poseduje sopstvena eksperimentalna niti klinička istraživanja, pa shodno tome, nije bilo potrebe za dodatnim etičkim odobrenjima. Translacioni značaj rada ogleda se u povezivanju prekliničkih mehanizama delovanja MSCs sa rezultatima kliničkih studija, obazirući se na prepreke i nedostatke u prelasku sa prekliničkih modela na rutinsku kliničku primenu. Poseban fokus je usmeren na bezbednosne aspekte, standardizaciju MSCs proizvoda i ključne poteškoće u razvoju kliničkih studija.

4.6. Ograničenja metodološkog pristupa

Obzirom da je rad pisan kao narativni pregled, poseduje i određena ograničenja:

- moguć uticaj bias-a publikacija, jer su studije sa pozitivnim rezultatima češće objavljivane
- velikaheterogenost studija (različiti modeli, izvori MSCs, doze i rute primene)
- mali broj kliničkih studija o MSCs derivatima, što otežava donošenje čvrstih zaključaka o njihovoj efikasnosti

Uprkos postojanim ograničenjima, ovakav pristup daje sveobuhvatan pregled trenutnih istraživanja i ukazuje na potencijal budućih istraživanja u cilju razvoja MSCs terapije za neurodegenerativna oboljenja.

5. Pretkliničke studije

Pretkliničke studije su osnova razumevanja terapijskog potencijala MSCs u lečenju neurodegenerativnih oboljenja. Njihov značaj se ogleda kroz pružanje uvida u mehanizme delovanja MSCs i kao filter koji razdvaja teorijuod prakse u lečenju. Pretkliničke studije su faza istraživanja koja ima za cilj određivanje bezbednosti, efikasnosti i načina primene u kliničkim studijama, odnosno dokazuju biološku opravdanost pre samog korišćenja na ljudima (49).

5.1. Studije na životinjskim modelima – MSCs terapija

Studije na životinjskim modelima su faza u razvoju terapije MSCs koja se ne može izostaviti, predstavljajući sistematsko i kontrolisano ispitivanje bezbednosti MSCs, kao i biodistribucije i mehanizama delovanja pre prelaska na klinička ispitivanja (4,2,26). Razlikuju se od *in vitro* sistema, koji inače pružaju ograničen uvid u složene biološke interakcije, životinjski modeli pružaju posmatranje MSCs u dinamičnom i integrisanom okruženju organizma, uključujući interakcije sa imunskim sistemom, vaskularnim komponentama i svojevrsnim mikrookruženjem CNS-a (27,31). Značajne prednosti ovih modela je mogućnost precizne kontrole eksperimentalnih uslova, što uključuje vreme primene terapije, dozu i način aplikacije MSCs. Kroz ovakav tip studija utvrđeno je da različiti putevi primene rezultiraju značajno različitim ishodima. Na primer, intranazalna primena omogućava zaobilaženje KMB i direktan transport ćelija u CNS (42,50,51), dok intravenska primena često rezultuje zadržavanjem MSCs u perifernim organima, posebno u plućima (25,52). Dok u pojedinim eksperimentalnim uslovima pokazalo se da intraarterijski primenjene MSCs nisu pronađene u moždanom parenhimu (53), što je ukazalo na smanjenu sposobnost njihove direktne migracije u ciljno tkivo. Navedeni rezultati iz studija na životinjskihm modelima uticali su na razumevanje načina delovanja MSCs. Umesto ideje da MSCs ostvaruju efekat diferencijacijom i zamenom oštećenih ćelija, danas je poznato da njihovi dominantni efekti su posledica parakrinih mehanizama delovanja (32,35,52). MSCs luče širok spektar bioaktivnih molekula, uključujući citokine, faktore rasta i MSCs-EVs, koji utiču na okolno tkivo, modulišu inflamatorni odgovor i podstiču regenerativne procese (21,22,34). U životinjskim modelima pokazano je da MSCs utiču na aktivaciju mikroglije, stimulisati autofagiju i poboljšati klirens patoloških proteina (54,55), čime direktno menjaju tok patoloških procesa, iako same ćelije često ne opstaju dugoročno u tkivu. Još jedna značajna prednost životinjskih modela, koja se može izdvojiti je mogućnost praćenja funkcionalnih ishoda terapije. To se postiže različitim bihejvioralnim testovima i neurološkim procenama, što je pokazalo da primena MSCs

može dovesti do poboljšanja kognitivnih i motoričkih funkcija eksperimentalnim uslovima (56,57). Ovi podaci su od posebne važnosti jer omogućavaju povezivanje molekularnih i ćelijskih promena sa funkcionalnim ishodima, što što omogućava procenu kliničkog potencijala same terapije (57). Sem navedenog, životinjski modeli omogućavaju ispitivanje imunomodulatornih svojstava MSCs u celovitom organizmu. MSCs pokazuju sposobnost da utiču na različite komponente imunskog sistema, što je potvrđeno u brojnim eksperimentalnim studijama (58,59). Ovo je od važnosti zbog degradacionih procesa poput neuroinflamacije (59). Životinjski modeli imaju i značajna ograničenja. Jedan od postojećih problema je razlika između životinjskih i humanih sistema, što uključuje varijacije u imunološkom odgovoru, strukturi i funkciji mozga, kao i u samoj prirodi i progresiji bolesti (6,7,60). Ove razlike mogu dovesti do toga da rezultati koji su obećavajući u životinjskim modelima ne budu u potpunosti reprodukovani u kliničkim studijama (25,26,60). Razlike u dizajnu studija što uključuje različite izvore MSCs, metode izolacije, doze i protokole primene dodatno otežava poređenje rezultata i standardizaciju terapijskih pristupa (19,25). Ograničenja predstavlja nemogućnost životinjskih modela da u potpunosti reprodukuju kompleksnost humanih neurodegenerativnih bolesti, koje se razvijaju tokom dužeg vremenskog perioda (45,47). Ujedno, kratak životni vek eksperimentalnih životinja onemogućava praćenje dugoročnih efekata terapije i mogućih neželjenih reakcija (45). Uprkos svemu navedenom studije na životinskim modelima su neophodne za razvoj MSCs terapije (47).

5.1.1. Studije na životnjskim modelima AB- MSCs terapija

AB je jedan od češćih modela neurodegeneracije u prekliničkim studijama, razlozi ovome su dobro definisana patologija, dostupnost pouzdanih životinjskih modela i neophodnost razvoja terapije, koja može prevazići trenutno aktuelne simptomacke terapije (61).Obzirom da u slučaju ovog oboljenja imamo pozadinsku postojeću patologiju, koja se ogleda u preplitanju složenih mehanizama, poput amiloidne i tau patologije, neuroinflmacije, oksidativnog stresa, sinaptičke disfunkcije i gubitka neurona, AB je adekvatan model za ispitivanje terapijskog potencijala MSCs (32). U prekliničkim studijama su aktuelni transgeni mišiji modeli koji ekspirmiraju humane mutacije gena, koji su u vezi sa familijarnim oblikom AB, poput APP, PSEN1i PSEN2, eventualno njihovih kombinacija APP/PS1, 5Xfad. Ovi modeli reprodukuju ključne patološke karakteristike bolesti, kao što su akumulacija Aβ peptide, formiranje plakova, sinaptičku disfunkciju i kognitivni deficit (26).

Primena MSCs u preklinićkim studijama AB sprovodi se relativno kroz standardizovane eksperimentalne protokole, oni se mogu razlikovati u zavisnosti od cilja studije, faze bolesti, ili izabaranog životnjskog modela. Čest pristup se bazira na primeni MSCs u trenutku kada su patološke promene već prisutne i na taj način se sprovodi simulacija terapijskog, u isto vreme, ne preventivnog modela intervencije (32,61). Izvori MSCs korišćene u prekliničkim studijama su poreklom iz košane srži, masnog tkiva i pupčane vrpce. MSCs koje se izoluju iz koštane sži su u istoriji najčešće korišćene, zbog svojih dobrih karakteristika i dostupnosti u ranijim istraživanjima. U novijim istraživanjima se sve češće koriste MSCs poreklom iz pupčane vrpce i Varnonove želatine, jer poseduju veću mogućnost proliferacije, stabilnijeg su fentipa i imaju jači parakrini potencijal, što bitno za neurodegenrtivna oboljenja (26,32).

Rute primene koje se najčešće koriste u životinjskim modelima AB su intravenska, intracerebroventrikularna/intra-hipokampalna i intratekalna aplikacija. U studijama u kojima je cilj veća translaciona relevantnost je obično izbor intravenska primena, jer ona odgovara klinički izvodljivim mogućnostima aplikacija terapije kod ljudi. Nasuprot njoj, za eksperimentalne svrhe najčešće se bira intracerebralna ruta, jer je važno i saznanje kakvi su lokalni efekti MSCs u specifičnim moždanim regionima, poput hipokampusa i korteksa (61,62).

Što se tiče doziranja i načina primene, doze MSCs u životinjskim modelima mogu izrazito varirati između studija, ali najčešći raspon je od 10^5do 10^6 ćelija po aplikaciji. Pojedini protokoli izriču pojedinačnu primenu, dok drugi koriste ponovljene doze u određenim vremenskim intervalima, u zavisnosti od progresije patologije i ciljanog efekta. Vremenski razmak između aplikacija se prilagođava fazi bolesti, što dodatno utiče na raznolikosti razultat u različitim studijama (32).

Od važnosti je razumeti cilj ovakvih studija, odnosno da se u ovim modelima MSCs primenjuju kao modulatori patološkog okruženja, a ne kao potencijalne zamene oštećenih neurona. U ovakvim eksperimentima, cilj najčešće biva fokusiran na ispitivanje MSCs na inflamaciju, sinaptičku stabilnost, proteostazu kao i opštu neuronsku homoestazu, dok se istovremeno terapijski efekti ispituju u posebnim segmentima istraživanja (61).

Jedna od najčešćih uzročnika AB je Aβ patologija i samim tim, na otklanjanju ovog patološkog mehanizma bi trebala da se bazira potencijalno uspšna terapija. U velikom broju AB modela, MSCs terapija je povezana sa smanjenjem Aβ depozita i smanjenjem toksičnih rastvorljivih formi Aβ, ovo se može definisati kao posledični efekat imunomodulacije i pojačanog klirensa (62,63). U transgenim AB modelima, poboljšanje neuropatologije i kognicije sa paralelnom modulacijom neuroinflamacije je u direktnoj vezi sa hUCB-MSCs, odnosno MSCs poreklom iz pupčane vrpce. Ovo je relevantno, jer je mikroglijalna aktivacija jedan od glavnih regulatora Aβ klirensa (53,63). Multipotentne

mezenhimske stromalne ćelije poreklom iz koštane srži nakon intracerebralne transplantacije u AB miševe, opisano je smanjenje Aβ depozita i poboljšanje memorije, na osnovu toga se može zaključiti da je imunološka modulacija u CNS mikrookruženju važan posrednik efekta (62). Kod MSCs izolovanih iz adipoznog tkiva pokazano je da intravensko ubrizgavanje može imati prevenetivni/terapijski efekat na ponašanje i patologiju kod AB miševa. Ovo se može objasniti kombinacijom sistemackih i CNS efekata, iako je doprinos direktnog prisustva ćelija u mozgu varijabilan (64). U pojedinim studijama je pokazano da MSCs pozitivno utiču na efikasnost uklanjanja Aβ plakova, posticanjem autofagije i drugih mehanizama koje učestvuju u ćelijskom "čišćenju" u AB modelima, čime je umanjeno opterećenje Aβ depozitima (54).

Manji broj prekliničkih studija, u odnosu na Aβ patologiju, je usmerneno na uticaj MSCs terapija na tau patologiju. Iz tih radova proizilazi da MSCs terapija može uticati na smanjenje procesa koji su povezani sa tau patologijom, poput oksidativnog stresa i smanjenjema inflamatornih signala, gde je poznato da indukuju tau disfunkciju i dovode do poremećaja mikrotubula (61,63). Ovaj mehanizam se zansiva na tome da MSCs, kada smanjuju neuroinflamaciju, kao što su TNF-α/IL-1β osovine i utiču na smanjenje oksidativnog stresa, tada se smanjuje pritisak na kinazne puteve, koji doprinose na tau patološku fosforilaciju, pa je za očekivati stabilizaciju aksonskom transport i smanjen sinaptički stres (61). U transgenim modelima AB u kojima su istovremeno prisutne Aβ i tau patologija, kao što je 3xTg-AB model, MSCs se najčešće primenjuju kao terapijska strategija koja ne deluje direktno na tau protein, već na patološke procese koji nastaju kao posledica njegove akumulacije. Umesto direktnog uklanjanja tau agregata, MSCs utiču na niz patoloških mehanizama, uključujući neuroinflamaciju, oksidativni stres i sinaptičku disfunkciju, čime se ublažava oštećenje neurona i usporava progresija bolesti (61).

Jedan od najdoslednijih nalaza u različitim prekliničkim modelima AB je pokazalo da terapija MSCs utiče na promene inflamatornog mikrookruženja u mozgu, tako što ga pomera ka manjen inflamatornom stanju. Ovakav efekat se izražava kroz smanjenje nivoa proinflamatornih citokinina i u promenama funkcionalnog fenotipa mikroglije (62,63). U studijama na AB miševima pokazano je da intrahipokampalna ili intracerebralna primena MSCs može dovesti do imunološke modulacije, koju prati poboljšanje kognitivnih funkcija, pogotovo pamćenja, gde u isto vreme dolazi do smanjenja patoloških markera bolesti. Ovo je jedan od pokazatelja važnosti neuroinflamacije u patogenezi AB i osetljivost patoloških mehanizama na terapiju MSCs (62). Vrlo je bitan uticaj MSCs na mikrogliju, jer je u određenim modelma pokazano da MSCs podstiču antiinflamatornu aktivaciju mikroglije. Promene funkcionalnog stanja mikroglije utiče na ublažavanje neuropatoloških promena , a to je bitno, jer mikroglija direktno utiče na klirens Aβ, integritet sinapsi i ukupni citokinski balans u centralnom nervnom sistemu (65).U procesu neurodegenracije, pojavljuju se različiti oblici astroglijalne

reaktivnosti, koji mogu imati i zaštitnu i štetnu ulogu, međutim MSCs ne utiču direktno na sve astroglijalne podtipove, pa time njihovo modulatorno dejstvo na inflamatorno mikrookruženje indirektno utiče na astroglijalni doprinos sinaptičkoj disfunkciji i progresiji bolesti (20).

U prekliničkim studijama AB, jedan od najvažnijih funkcionalnih ciljeva MSCs terapije jeste očuvanje sinapsi i sinaptičke plastičnosti, obzirom da je gubitak sinapsi među prvim uzročnicima kognitivnog propadanja (61,63). Više istraživanja pokazuje da je primena MSCs u AB modelima u vezi sa uvećanom ekspresijom markera neurogeneze i sinaptičke aktivnosti, naročito u hipokampusu. Ovo se najčešće objašnjava parakrinim efektom MSCs, odnosno lučenja faktora koji povoljno utiču na lokalno neuronsko mikrookruženje (66). U određenim eksperimentalim uslovima pokazalo se da MSCs terapija je povezana sa aktivacijom signalnih puteva uključenih u neurogenezu i neuronalnu diferencijaciju u hipokampusu. Molekulske promene koje proizilaze iz ovoga se manifestuju na funkcionalnom nivou, poboljšanim u testovima učenja i pamćenja, ponovo ukazujući na značaj MSCs u očuvanju funkcionalnog integriteta neuronskih mreža (57).

Često se u prekliničkim eksperimentima AB objašnjava značaj intervencija iz kojih proizilazi smanjenje oksidativnog stresa u CNS-u. Ovaj efekat se postiže smanjenjem neuroinflamacije, a delom kroz podršku endogenim antioksidativnim mehanizmima neurona i ovo pokazuje indirektni uticaj na smanjenje mitohondrijalnog opterećenja i energetskog stresa ćelija (61,63). U indukovanim modelima AB, poput Aβ-injekcionih ili toksikometaboličkih modela MSCsse mogu koristiti samostalno ili u kombinaciji sa drugim terapijama, ispitivajući doprinos oksidativnog stresa i inflamacije u patogenezi bolesti. U ovakvim eksperimentima, MSCs su pokazale potencijal ublažavanju oksidativnog oštećenja i uticaj i uticaj na stabilizaciju neuronskog okruženja (67).

5.1.2.Studije na životinjskim modelima ostalih neurodegenerativnih oboljenja-MSCs terapija

PB

U prekliničkim istraživanjima PB, terapija MSC često je ispitivana na životnjiskim modelima, koji oponašaju gubitak dopaminergičnih neurona, kao što su 6-OHDA modeli kod pacova ili MPTP modeli kod miševa, ali su se koristili i modeli u kojima dominira patologija α-sinukleina (6,7). Cilj ovakvih studija se ne bazira na stvaranju novih neurona, sa ciljem zamene izgubljenih, već je cilj zaštita postojećih neurona i promena patološkog mikrookruženja u mozgu, sve u smeru usporavanja progresije bolesti (7,11).

U prekliničkim studijama PB korišćene su različite rute primene MSCs, uključujući intracerebralnu, intranazalnu i intravensku. Svaka od ovih ruta ima svoje prednosti i ograničenja u pogledu biodistribucije i mehanizma delovanja (42,50,51). Dok, izvor MSCs (koštana srž, masno tkivo, pupčana vrpca) i način njihove pripreme mogu značajno uticati na sekretorni profil i terapijski efekat, zbog čega se rezultati različitih studija ne mogu uvek direktno porediti (10,26).

Jedan od najčešćih nalaza u prekliničkim studijama je poboljšanje motornih simptoma nakon MSCs terapije, a ovo poboljšanje se manifestuje kroz poboljšanom kordinacijom, smanjenom asimetrijom pokreta i poboljšanjem lokomocije. Uz celokupno boboljšanje svih navedneih simptoma prati i očuvanje dopaminergičnih neurona i njihovih završetaka u strijatumu (6,7). U određenim studijama, intranazalna primena MSCs pokazala se kao efikasan pristup koji omogućava da ćelije ili njihovi efekti dospeju do CNS-a, a propratni efekat je poboljšanje motornih pokreta kod životinja sa parkinsonizmom (50). Intranazalna metoda kao neinvazivna sa potencijalom da zaobiđe neke sistemacke barijere, sve češće se uzima u obzir kao alterantivni način primene, odnosno aplikovanja MSCs u PB(42,51). Jedna od ovih studija je bila ona gde su korišćeni MPTP modeli PB, a izvor MSCs je bio poreklom iz masnog tkiva, koje su najčešće primenjivane intravenoznim putem. Iako direktna prisutnost ćelija u mozgu nije uvek bila potvrđena, terapija je terapija je pokazala da je došlo do smanjenja oksidativnog stresa, kao i smanjenom aktivacijom mikroglije i poboljšanjem motornih performansi životinja. Ovi rezultati podržavaju hipotezu da MSCs deluju dominantno posredno, kroz modulaciju sistemske i centralne inflamacije, kao i da utiču na stabilizaciju mitohondrijalne funkcije neurona (51,68).

Okrenuvši se na uticaj MSCs na neuroinflamaciju i mikrogliju, MSCs su pokazale modulacijski efekat na nauroinflamaciju, koja je prisutna u već navedenom oboljenju. U PB, hronično aktivirana mikroglija doprinosi progresiji neurodegeneracije lučenjem proinflamatornih citokina i povećanje oksidativnog stresa (7,10). U prekliničkim studijama pokazalo se MSCs imaju uticaj na promeu aktivacionog stanja mikroglije, time što je pomeraju ka reparativnijem, antiinflamatornom fenotipu. Iz ovoga proizilazi manje toksično okruženje u mozgu (68). U nekim radovima je od bitnosti istaknuto da MSCs, upravo preko modulacije mikroglije, mogu doprineti boljem uklanjanju patološkog α-sinukleina, iz čega je proizašlo da su inflamacija i poremećaj proteostaze, kao dva bitna procesa za razvoj PB(7,68).

U PB, agregacija α-sinukleina dovodi do taloženja proteina i do poremećaja sinaptičke funkcije, mitohondrijalne dinamike i transporta unutar neurona (7). MSCs u ovom slučaju imaju indirektni uticaj na uslove u kojima nervne ćelije i glijalne ćelije efikasnije reaguju na proteinsko opterećenje. To se postiže smanjenjem inflamacije i podrškom fiziološkim mehanizmima uklanjanja patoloških proteina (10,68).

U radu Park i saradnika ispitivao se efekat koštano-sržnih MSCs u eksperimentalnim modelima PB, gde je bila izražena α-sinuklein patologija. MSCs su primenjene intracerebralno, a dobijeni rezultati pokazali su da terapija dovodi do polarizacije mikroglije ka M2 (antiinflamatornom) fenotipu, što je bilo praćeno povećanim klirensom α-sinukleina. Ovi nalazi su direktno povezali MSCs terapiju sa jednim od ključnih patoloških procesa u PB i potvrdili su pretpostavku da imunomodulacija predstavlja centralni mehanizam njihovog dejstva (68).

Značajnost MSCs u terapiji PB se ogleda i kroz parakrini efekat, zbog svojstva da luče faktore koje mogu imati funkciju podrške na preostale dopaminergične neurone i njihove sinapse. U prekliničkim modelima PB, ovakva podrška može uticati na stabilniju sinaptičku komunikaciju i na usporavanje funkcionalnog propadanja neuronskih mreža (10,32). Ovo je od važnosti jer sinaptičke promene se dešavaju pre masivnom gubitku neurona, pa očuvanje sinapsi može imati značajan funkcionalni efekat čak i u ranijim fazama bolesti, kao što je slučaj i kod AB (7,43).

Osetljivost dopaminergičnih neurona na oksidativni stres je izuzetno velika, jer imaju visoke enrgetske potrebe i samog metabolizma dopamina. Zato u patogenezi PB, mitohondrijalna disfunkcija i povećana produkcija ROS je od značaja (7). MSCs su se u ovom slučaju pokazale kao potencijalno korisna terapija za smanjenje oksidativnog opterećenj neurona, delom posredno, smanjenjem inflamacije, a drugim delom aktivno, jer smanjuju aktivaciju endogenih antioksidativnih mehanizama u nervnom tkivu (10,22). Ovakvi efekti MSCs su potvrđeni u više nalaza, odnosno istraživanja neurodegenerativnih modela, gde je terapijski potencijal MSCs ustanovljen kroz doprinos očuvanju mitohondrijalne funkcije i energetske ravnoteže neurona (10,22).

U studiji Danielyan i saradnika korišćen je 6-OHDA model PB kod pacova, pri čemu su MSCs poreklom iz koštane srži primenjene intranazalnim putem. Autori su pokazali da ovakav način primene omogućava MSCs da zaobiđu KMB i dospeju u relevantne moždane regione. Nakon terapije primećeno je značajno poboljšanje motornih funkcija, kao i očuvanje dopaminergičnih neurona u *substantia nigra*, iz čega je proizašao zaključak da MSCs imaju jak neuroprotektivni potencijal čak i bez primene direktne intracerebralne transplantacije (50,51).

Nekolicina od mnogobrojnih prekliničkih studija PB pokazale su značajnu varijabilnost u dozama MSCs, koje se najčešće kreću u rasponu od 10^5 do 10^6 ćelija po aplikaciji, uz razlike u broju ponovljenih doza i vremenskom razmaku između aplikacija. U nekim eksperimentalnim protokolima ponovljena primena MSCs dovela je do dugotrajnijih funkcionalnih poboljšanja, što je ukazalo da terapijski efekat ne zavisi samo od rute primene, već i od dinamike doziranja (50,51).

ALS

U prekliničkim modelima ALS korišćene su različite rute primene MSCs, u zavisnosti koji patološki mehanizam je bio u fokusu, kao i željene biodistribucije ćelija. Rute koje se najčešće primenjuju su intratekalna, intracerebroventrikularna, intravenozna i intramuskularna aplikacija(69,70).Obzirom na izraženost neuroinflamacije i degeneracije motornih neurona, koji se javljaju kod ovog oboljenja, veliku prednost je data intratekalnoj i intracerebroventrikularnoj aplikaciji, jer se ostvaruje direktniji kontakt MSCs sa nervnim tkivom i cerebrospinalnom tečnošću. Intravenozna primena je uglavnom korišćena kao sistemska strategija, jer je njen osnovni cilj imunomodulacija i smanjenje perifernih inflamatornih signala koji mogu doprineti progresiji bolesti (69,70). Što se tiče izvora MSCs, u ALS prekliničkim studijama najčešće su korišćene BM-MSCs, zatim AD-MSCs, kao i hUC-MSCs (69,70).

U cilju detaljnijeg sagledavanja terapijskog potencijala MSCs u ALS, rađeno je više preklničkih studija na životinjskim modelima, koji su pokazali glavne patološke karakteristke oboljenja, koje se odnose na bezpovratni gubitak neurona, oksidativni stres i jaku neuroinflamaciju. U ovakvim studijama često je korišćen eksperimentalni model SOD1transgeni miševi, kao adekvatni za praćenje efekta terapije, kod već pomenutog oboljenja (56). U studiji Vercelli i saradnika, korišćene su BM-MSCs, koje su intratekalno aplikovane u SOD1G93A miševa. Dobijeni rezultati ukazuju na značajnu smanjenost aktivacije mikroglije i astrocita, a ujedno je postignuto i smanjenje ekspresije proinflamatornih citokinina, što uključuje i TNF-α i IL-1β. Ovakav postignut efekat MSCs izazvao je promene u mikrookruženju, koje je bilo opterećeno inflamacijom,a dodatno je primećeno da je tok progresije motornih neurona je usporen i da im je omogućen duži vremenski period preživljavanja. Ovo ukazuje da imunomodulatorni efekat MSCs je od važnosti u ALS modelima (56). Značaj sistemske imunomodulacije dodatno je potvrđen u radu Uccelli i saradnika, gde su BM-MSCs primenjene intravenski. Bez obzira na ograničeno prisustvo MSCs u centralnom CNS-u, koje je ovde pokazano, uočeno je smanjeno prisustvo perifernih i centralnih inflamatornih signala, što je rezultiralo ublažavanjem neuroinflamacije u kičmenoj moždini i delimičnim očuvanjem motornih neurona. Ovi nalazi podržavaju koncept da terapijski efekti MSCs mogu biti posredovani i indirektnim, sistemskim mehanizmima, a ne isključivo direktnim delovanjem u nervnom tkivu (71).

Sem inflamacije, dodatno motorne neurone oštećuje i oksidativni stres, a poznato je da motorni neuroni imaju izražene energetske potrebe i senzitivniji su na poremećaje mitohondrijalne funkcije. U prekliničkim studijama je dokazano da terapije MSCs pozitivno utiču na smanjenje oksidativnog opterećenja nervnog tkiva, time što umanjuju stepen infamacije i time što jačaju endogene antioksidativne mehanizme. Na ovaj način se stabilizuje mitohondrijalna funkcija i neuronima omogućava duže očuvanje osnovnih fizioloških procesa (69).Ovaj postignut efekat MSCs je pokazan u preklinčkoj studiji Marconia i saradnika, da intratekalna primena adipocit-derivisanih MSCs u SOD1

modelu dovodi do smanjenja oksidativnog stresa i poboljšanja mitohondrijalne funkcije u motornim neuronima, što dovodi do sporijeg propadanja funkcija(57).

Ekscitotoksičnost i poremećaj homeostaze kalcijuma dovode do dodatnih oštećenja neurona kod ALS. MSCs ne deluju direktno kao antagonisti glutamatnih receptora, ali potspešuju smanjenje inflamacije i oksidativnog stresa, što indirektno stabilizacije kalcijumsku ravnotežu u neuronima, čime se umanjuje mogućnost od programirane ćelijske smrti (7,69). Važan aspekt patologije ovog oboljenja leži u propadanju neuromišićnih sinapsi. U prekliničkim studijama, MSCs terapija je pokazala da utiče na sporiji gubitak funkcionalnih neuromišićnih veza, a to se manifstuje usporenom progresijom motornih simptoma (41,69).

Pored uticaja MSCs u CNS-u, u prekliničkim studijama sprovođena su ispitivanja MSCs na neuromišićnu jedinicu, koja je od važnosti jer se u okviru nje dešavaju prva važna oštećenja u ALS-u(69).U istraživanju koje su sproveli Suzuki i saradnici, BM-MSCs i primenjivane intramuskularno, direktno u mišiće koji su inervisani pogođenim motornim neuronima, pokazale su da je došlo do smanjenja denervacije mišićnih vlakana očuvanja neuromišićnih sinapsi i odlaganja pojave motornog deficita. Ova studija je pokazala da je uticaj MSCs uočen i u perifernom nervnom sistemu (69).

Terapija MSCs u slučaju ovog oboljenja predstavlja terapiju koja utiče indirektno na osnovne patološke mehanizme, odnodno to znači da ne otklanja primarni uzroka nastanaka oboljenja, već utiče na inflamaciju, koja je jedan od glavnih faktora u progresiji bolesti in a taj način usporava njen tok, upravo, modulacijom inflamacije, oksidativnog stresa i energetske disfunkcije motornih neurona (70).

HB

U prekliničkim modelima HB korišćeni transgeni modeli su R6/2 i YAC128 miševi, koji eksprimiraju mutirani huntingtin protein, kao glavne patološke neuropatološke i funkcionalne karakteristike samog oboljenja. Pored genetskih modela, koriste se i toksični modeli zasnovani na primeni 3-nitropropionske kiseline ili hinolinske kiseline, koji selektivno oštećuju strijatum putem indukcije mitohondrijalne disfunkcije i energetskog kolapsa neurona. Korišćenjem različitih modela, moguće je ispitivanje efekta MSCs na više patoloških mehanizama HB (72,73).

U prekliničkim studijama HB korišćene su BM-MSCs, AD-MSCs i hUC-MSCs. hUC-MSCs su posebno interesantne zbog većeg proliferativnog kapaciteta, stabilnijeg fenotipa i izraženog parakrinog potencijala, što ih čini pogodnim za terapijsku primenu u neurodegenerativnim bolestima (74). Rute koje su se koristile su uglavnom intrastrijatalna i intracerebralna aplikacija, posebno u ranim

studijama gde je cilj bio direktno delovanje na pogođene moždane regione. U kasnijim istraživanjima više se ispitivala intravenska primena MSCs, kako bi se procenili njihovi sistemski i imunomodulatorni efekti, koji su od posebnog značaja s obzirom na izraženu inflamatornu komponentu bolesti (70,74). U studiji Yang et al., korišćen je transgeni mišji model HB (R6/2), u kojem su BM-MSCsstereotaksično aplikovane direktno u strijatum. Autori su pokazali očuvanje strijatalnih neurona, smanjenje atrofije tkiva i poboljšanje motoričke koordinacije, bez dokaza o diferencijaciji MSCs u neurone, što potvrđuje dominantno parakrino i mikrookruženjsko delovanje MSCs(74).Slični rezultati su potvrđeni i u radu Bantubungi et al., gde je lokalna transplantacija MSCs dovela do strukturne i funkcionalne neuroprotekcije u strijatumu, uz jasno odsustvo neuronalne zamene (75).

Neuroprotektivni efekat MSCs je u prekliničkim studijama više puta dokazan, kao što su studije gde su MSCs transplantirane u strijatum transgenih miševa. Ovde je uočeno očuvanje neuronske strukture, smanjenje gubitka neurona i ublažavanje motoričkih poremećaja (74,75). Na molekularnom nivou, terapija MSCs utiče na smanjenje oksidativnog stresa i poboljšanje mitohondrijalne funkcij, a posredno i stabilizuje mitohondrijalni membranski potencijal,smanjuje produkciju ROS i poboljšava energetsku homoestazu neurona. Sve ovo je izrazito važno za HB, jer je jedan od glavnih patofizioloških mehanizama mitohondrijalna funkcija (72,73). U eksperimentalnoj studiji Lin et al., MSCs poreklom iz adipoznog tkiva primenjene su intrakranijalno u HB modelu indukovanom ekspresijom mutiranog huntingtin proteina. Rezultati su pokazali smanjenje ROS, poboljšanje mitohondrijalne respiracije i normalizaciju ATP produkcije u strijatalnim neuronima, što je direktno povezano sa boljim neuralnim preživljavanjem (69) Dodatno, El-Akabawy et al. su u toksin-indukovanom HB modelu pokazali da MSCs terapija dovodi do stabilizacije mitohondrijalne membrane i smanjenja oksidativnog oštećenja lipida i proteina u CNS-u (73).

Još jedan pozitivan uticaj terapije MSCs na ovo oboljenje je smanjenje stepena inflamacije. Pretkliničke studije su pokazale smanjenu aktivaciju mikroglije i smanjenu količinu proinflamatornih citokinina u strijatumu, formiranjem adekvatnijeg mikrookruženja koje omogućava veći opstanak neurona. Značaj ovog efekta je još veći, jer neuroinflamacija negativno utiče na toksičnu manifestaciju mutiranog huntigtin proteina (75,76). U radu*Lee et al*., MSCs iz umbilikalne vrpce su transplantirane u strijatum HB miševa, pri čemu je primećeno je smanjenje aktivirane mikroglije, kao i pad ekspresije TNF-α i IL-1β. Autori su zaključili da MSCs menjaju inflamatorni status CNS-a i time indirektno smanjuju neurotoksične efekte mutiranog huntingtina (76). Sličan imunomodulatorni efekat potvrđen je i u studiji Bantubungi et al., gde je antiinflamatorni odgovor korelirao sa očuvanjem strijatalnih neurona (75).

MSCs terapija utiče na usporavanje toka bolesti i ublažavanje simptoma oboljenja u ranim srednjim fazama bolesti, a ovo je pokazano kroz više prekliničkih studija, gde je uticaj terapije ima za posledicu poboljšanje motoričkih funkcija i delom je doveo do očuvanja kognitivnih funkcija (70,74). U longitudinalnoj studiji Dey et al., primena MSCs u HB modelu dovela je do poboljšanja rezultata u testovima motoričke koordinacije i ravnoteže, kao i delimičnog očuvanja kognitivnih funkcija. Efekti su bili izraženiji u ranim fazama bolesti, što ukazuje na potencijal MSCs terapije kao modulatora progresije (77).Ovi nalazi su u skladu sa ranijim studijama koje pokazuju da funkcionalni benefiti MSCs terapije prate molekularne i inflamatorne promene u strijatumu (74).

MS

U osnoviMS je autoimuna inflamacija CNS-a, koja posledično dovodi do demijelinizacije, samim tim i do aksonskog oštećenja, rezultirajući neurodgeneracijom. U prekliničkim istraživanjima, MS je uglavnom proučavana na modelu eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE). Ovaj model je pogodan za ovaj tip istraživanja, zbog mogućnosti oponašanja ključnih patofizioloških proseca ove bolesti, što uključuje i aktivaciju autoreaktivnih T limfocita, infiltraciju imunskih ćelija u CNS-u, kao i razvoj neuroloških deficit (58,78). Izvori MSCs koji se najčešće koriste u ovim prekliničkim studijama su poreklom iz pupčane vrpce, koštane srži ili masnog tkiva. Ruta koja se najčešće primenjuje jeste itravenska, a ređe korišćene su intratekalna ili još ređe aplikacija MSCs direktno u CNS. Primećeni efekat prati neznačajna akumulacija MSCs u nervnom tkivu, a efekti su parakrini i imunomodulatorni (79,80). U klasičnim prekliničkim studijama Zappia i saradnika (58) i Rafei i saradnika (59), EAE je indukovan kod miševa imunizacijom MOG/MBP peptidima, čime je postignuta aktivacija autoreaktivnih T limfocita, infiltracija CNS-a i razvoj neuroloških deficita. Ove studije su pokazale da EAE oponaša inflamaciju, demijelinizaciju i neurološko propadanje karakteristično za MS, što ga čini standardnim modelom za ispitivanje MSCs terapije (58,78).

Najdosledniji terapijski efekat koji se ispoljio u EAE modelima MS je imunomodulatorni efekat, koji je ujedno i najvažniji za potencijalnu terapiju ovog oboljenja. Brojne studije su pokazale efikasnost MSCs u smanjenju akivacije autoreaktivnih T limfocita, pogotova Th1 i Th17 populacija, koje imaju centralnu ulogu u patogenezi MS. Još jedan efekat MSCs je uticaj na porast regulatornih T ćelija, što posledično dovodi do pomeranja imunskog odgovora ka manje inflamatornom tipu (59,78). Ove promene koje su izazvale MSCs su dovele do manjeg prodora imunskih ćelija u CNS-u, a samim tim je smanjen upalni proces koji se javlja u mijelinskim strukturama, zbog prodora imunskih ćelija (59,78). U studiji *Zappia* i saradnika, korišćena je intravenska primena MSCs u EAE modelu dovevši do značajnog smanjenja proliferacije autoreaktivnih T limfocita, znatno Th1 i Th17 populacija, gde

je u isto vreme došlo do povećanje regulatornih T ćelija(Treg)**.**Slične rezultate su pokazali Rafei i sar., da MSCs menjaju citokinski profil, smanjujući IFN-γ i IL-17, dok povećavaju IL-10 i TGF-β, dovodi do pomeranja imunskog odgovora ka manje inflamatornom profilu (58,59).

Sem uticaja na periferni imunski sistem, mezenhimske matične ćečije imaju nepovoljan uticaj na loklnu inflamaciju u CNS-u. Smanjena aktivacija mikroglije i doprinos MSCs ka njenom preusmeravanju ka antiinflamatornom fenotipu su neki od pozitivnih efekata MSCs. Ovaj efekat prati smanjenje nivoa proinflamatornih citokinina, kao što su TNF-α i IL-1β, u mozgu i kičmenoj moždini (79,81). Obzirom da hronična aktivacija mikroglije ima izrazit uticaj u progresiji aksonoskog oštećenja i neurodegeneacija kod ovog oboljenja, naveden efekat se smatra da je od važnosti, kao mehanizam indirektne neuroprotekcije (82). U radu Gerdoni i sar., histopatološkom analizom CNS-a tkiva EAE miševa tretiranih MSCs uočeno je značajno manji broj infiltrirajućih limfocita i makrofaga u kičmenoj moždini, što ukazuje na korelaciju sa blažim kliničkim simptomima i sporijom progresijom bolesti (59,78).

Poznato je da se MSCs ne diferenciraju direktno u oligodendrocite i bez obzira na to u više studija je primećeno da je došlo do smanjenja procesa demijelinizacije i očuvanje aksonske strukture kod EAE životinja tretiranih MSCs. Postizanje ovakvih efekata prepisuje se imunomodulatornom svojstvu MSCs, što posledično poboljšava mikrookruženje i sve ovo dovodi do aktivacije unutrašnjih mehanizama za reparaciju (80,83). U nekim studijama je zabeleženo i smanjenje aksonski gubitaka, a to je od izrazite važnosti, jer osnovni uzrok MS upravo se bazira na gubitku aksona (83). U studijama Kassis i sar. i Bai i sar.**,** korišćene su EAE životinje, koje su tretirane MSCs, a rezultati su pokazali manji stepen demijelinizacije, bolje očuvanu aksonsku strukturu i manji stepen degenracije aksona. Autori pretkliničke studije smatraju da su ovi efekti posledica smanjenog inflamatornog stresa i poboljšanja mikrookruženja, koje je omogućilo aktivaciju unutrašnjih reparativnih mehanizama (80,83).

Što se tiče funkcionalnih postignuća, nakon terapije MSCs u EAE modelima je dovela do boljih motoričkih funkcija, došlo je do smanjenja paralize, odnosno, poboljšanja pokretljivosti, a produžen je i period remisije. Ovi efekti dovode do zaključka da MSCs imaju mogućnost usporavanja toka bolesti, kao i blaže kliničke manifestacije. Ovi efekti se postižu, naročito, ako se terapija primeni u ranijim i srednjim fazama bolesti (58,78). Ne može se reći da terapija MSCs dovodi do potpunog izlečenja ili oporavka, ali modifikuje tok bolesti (59,83).

5.2. Studije na životinjskim modelima- terapija MSCs derivatima

Studije na životinjskim modelima su nezamenljiv korak u razvoju terapije koja se bazira na derivatima MSCs, omogućavajući procenu njihove bezbednosti, biodistribucije i osnovnih karakteristika u kompleksnom biološkom sistemu pre same kliničke primene (12,15,21). Za razliku od same MSCs terapije, derivati poput MSCs-EVs i MSCs-Sec predstavljaju „cell-free" pristup, i time zahtevaju drugačiji način njihovog ispitivanja (32,36). Životinjski modeli omogućavaju praćenje distribucije i stabilnosti navedenih derivata u organizmu. Pogotovo je značajna njihova sposobnost da dospeju do CNS-a. Pokazano je da zbog svoje male veličine mogu prolaziti kroz KMB, što je značajna prednost u odnosu na ćelijsku terapiju (12,15,38,39). Primenom različitih metoda obeležavanja moguće je pratiti njihovo kretanje i sudbinu u organizmu, što može pružiti koncizniju analizu biodistribucije u *in vivo* uslovima (21,30). Ovi modeli omogućavaju kontrolu eksperimentalnih parametara, poput doze i načina primene, pri čemu različiti putevi aplikacije (intravenski, intranazalni, intracerebralni) dovode do razlika u biodistribuciji (12,15,42). U tom kontekstu, životinjski modeli su bitni u određivanju optimalne doze, učestalosti primene i farmakokinetičkih karakteristika MSCs derivata (21,26). Poseban značaj životinjskih modela manifestuje se kroz mogućnosti procene konzistentnosti i reproduktivnosti MSCs derivata, znajući da njihov sastav je varijabilan u zavisnosti od izvora MSCs i uslova u kojima su proizvedene (21,26,29). Životinjski modeli omogućavaju i poređenje različitih serija (batch) derivata, što je od značaja za njihovu standardizaciju i moguću kliničku primenu (26). Ovi modeli se koriste za ispitivanje modifikovanih, odnosno „inženjerskih" derivata, zahtevajući detaljniju procenu njihovog ponašanja u *in vivo* uslovima (28,30). Iako se MSCs derivati smatraju bezbednijim u odnosu na ćelijsku terapiju, zbog odsustva rizika od proliferacije i diferencijacije ćelija, svakako su životinjski modeli neophodni da bi potvrdili bezbednost, procenu potencijalne toksičnosti i imunogenosti MSCs derivata (21,26). Sem navedenog, ovi modeli se koriste za ispitivanje kombinovanih terapijskih pristupa, gde se MSCs derivati mogu koristiti zajedno sa drugim terapijskim agensima, poput farmakološke i nanotehnološke strategije (17,18). Takođe, životinjske modele karakterišu i određeni nedostaci. Razlike između životinjskih i humanih sistema, kao i nedostatak standardizovanih metoda za izolaciju i karakterizaciju derivata, otežavaju poređenje rezultata i njihovu translaciju u kliničku praksu (6,21,25,26). Takođe, ovi modeli ne mogu u potpunosti reprodukovati kompleksnost humanih neurodegenerativnih bolesti, obzirom na genetsku, morfološku i fiziološku različitost (6,7).Uprkos navedenim ograničenjima, studije na životinjskim modelima su neophodne za razvoj terapije MSCs derivatima (12,15,32).

5.2.1. Studije na životinjskim modelima AB - terapija MSCs derivatima

U poslednjih nekoliko godina, pretkliničke studije u cilju ispitivanja potencijala SCs u AB sve više usmeravaju fokus na MSCs derivatei na njihov terapijski potencijal. Naveden terapijski pristup, koji se usmerava na derivate MSCs, naziva se "cell-free terapija"(32,84).Cell-free terapija se zasniva na parkrinom delovanju biološki aktivnih molekula koje oslobađaju MSCs, a utiču na izmene u patološkom mikrookruženju CNS-a, koje je prisutno kodneurodegenerativnih bolesti (32,84). MSCs derivati obuhvataju MSCs-Sec, MSC-CM i MSCs-EVs, među kojima su najviše proučavani MSC-Exo (32,84). Prednost ovakvog pristupa leži u praktičnosti i metodološkoj jednostavnosti u preklničkim studijama, jer omogućava istraživanje efekata samih signalnih molekula koje izlučuju MSCs, a pritom ne dolazi do opasnosti od nepredvidivog ponašanja, moguće migracije ili ograničenog vremena preživljavanja, gde sva ova pitanja prate ćelijske terapije. Ovakav vid terapije ima dosta benefita, kao što su: lakše doziranja, veća standardizacija preparata, lakše skladištenje i niži rizici u odnosu na ćelijsku terapiju (32,84).

Tokom prekliničkih studija na modelima AB, vodeća istraživanja se izvode u cilju saznanja kakav uticaj derivati MSCs imaju na dominantne patološke mehanizme ovog oboljenja, poput Aβ patologije, neuroinflamacije, sinaptičke disfunkcije, oksidativnog stresa, dok je uglavnom uticaj na tau patologiju indirektan (preko modulacijeinflamatornih i oksidativnih signalnih kaskada) (32,84). Eksperimentalni modeli koji se najčešće primenjuju kod ovog tipa prekliničkih studija su različiti transgeni i indukovani modeli, kao što su na primer APP/PS1, ali koriste se i kombinovani modeli u kojima koegzistiraju Aβ i tau mehanizmi (61). U sprovođenju ovakvih ispitivanja, fokus je na posrednim mehanizmima, koji doprinose razvoju tau patogeneze, a ne na mehanizmima koji utiču direktno na tau patologiju (61).

Rute primene koje najčešće bivaju korišćene su intravenska, intracerebralna/intrahipokampalna, intraventrikularna, u zadnjih nekoliko godina sve češće se koristi i intranazalna aplikacija. Razlog sve čećem korišćenju intranazalne aplikacije u prekliničkim modelima AB je potencijal zaobilaska KBM (84,85).

Kombinovani mehanizam delovanja derivata MSCs je najčešće analizirano dejstvo, a kao takvo ima izuzetan terapijski potencijal, obzirom da je poznato da osnovni uzrok AB je kompleksan, odnosno, predstavlja kombinaciju više patoloških mehanizama kao što su dizbalans homoestaze proteina, inflamacija i poremećaj sinaptičke stabilnosti (32,84).

Jedan od najbitnijih efekata derivata MSCs u AB modelima je smanjenje Aβ opterećenja, drugim rečima, poboljšanje Aβklirensa i smanjenje depozita. Ovaj naveden efekat, obično se pripisuje MSCs-Exo jer su nosioci bioaktivnih molekula, kao što su miRNA, proteini, lipidi ii drugi, jer oni menjaju funkcionalno stanje mikroglije i stimulišu fagocitozu Aβ (32,84). Konkretno je ispitivan uticaj MSCs-Exo na smanjenje Aβ depozita u mozgu i paralelno su praćene kognitivnih funkcija, kroz testove pamćenja i učenja. Primećen efekat MSCs-Exoje smanjenje Aβ plakova, kao i do kognitivnog napredovanja (86,87). Uticaj egzosoma je bio indirektan, odnosno, postignute su promene u mikrookruženju i promene glijalnog odgovora, što je za posledicu dovelo do povećane sposobnosti CNS-a da sam uklanja patološke proteine (86,87). Ovaj efekat je pokazan u prekliničkoj studiji Losurda i saradnika, gde je primena derivata MSCs, konkretno MSCs-Exou AB transgenom mišijem modelu dovela do redukcije Aβ opterećenja, a time je ishod pratio i neurološko poboljšanje (88).

U prekliničkim ispitivanjima pokazano je da MSCs-Sec, dovodi do poboljšanja kognitivnih performansi, popravljanju patološkog mikrookruženja. Ovaj efekat je postignut u prekliničkoj studiji Santamaria i saradnika, korišćenjem intranazalne aplikacije MSCs-Sec u AB modelu, potvrdivši efikasnost “cell-free” terapije (87,89).

Neuroinflamacija je jedan od najdestruktivnijih patoloških mehanizama, koji se javalja u osnovi AB, a zasniva se na tome da mikroglija i atrociti prelaze u reaktivno stanje, luče se citokinini kao što su TNF-α, IL-1β, IL-6, dolazi do povećane ekspresije iNOS/COX-2 kao i aktivacije signalnih puteva poput NF-kB (87). Sve ovo dodatno negativno utiče na sinaptičku funkciju, povećava oksidativni stres i ubrzava degeneraciju neurona, tako da je glavni cillj usmeren na modulatornim mehanizmima (61,59).

U prekliničkoj studiji Elia i saradnika, korišćena je intracerebralna aplikacija MSCs-EVs u ranom AB modelu, koja je rezultirala smanjenjem Aβ depozita, ali ujedno je uticala na inflamatorni profil mozga, što ukazuje da MSCs-EVs utiču i na modulaciju glijalnog odgovora,a ne samo na smanjenje Aβ plakova (84). Za razliku od MSCs-EVs, MSCs-CM pokazuje u preklničkim studijama pozitivan potencija u procesu modulacije inflamacije, ali mana je njegova varijabilnost, odnosno njegov potencijal zavisi od uslova kultivacije i protokola. Uprkos tome, postoje eksperimentalni dokazi da MSCs-CM može imati antiinflamatorno dejstvo u uslovima neurodegeneracije. Preklinički radovi pokazuju da hipoksičniMSCs-CM, a poreklom iz adipocita, utiče na smanjenje neuroinflamacije, time što aktivira regulatorne receptorne signalne sisteme, koji su povezani sa urođenim imunitetom (TLR mehanizmi). Ovaj uticaj je bitan, jer TLR-NF-kB osovina u AB modelima direktno održava proinflamatorno okruženje (90). U prekliničkim studijama se do sada pokazalo da efekat MSCs-Sec može se manifestovati smanjenjem inflamatornih parametara i poboljšanjem funkcionalnih ishoda, ali rezultati obično bivaju zavisni od uticaja proizvodnje. Postoje jasni dokazida antiinflamatorni uticaj

MSCs-Sec je primećen u preklinickim studijama u određenim modelima, time što dolazi do ispoljavanja promene u ponašanju životinja i promene inflamatornih markera (90).

Dominantan uticaj derivata MSCs, posebno MSCs-EVs je povezan sa sinaptičkom disfunkcijom, koja je jedan od najvažnijih i među prvim patološkim događajima koji se javljaju u toku bolesti i ujedno uzročnik kognitivnog propadanja,zbogAβ plakova i tau patologije (61,69). Gubitak sinapsi prati redukcija dentritskih bodlji, smanjenje sinaptičkih proteina, poremećaj glutamatne neurotransmisije i pad LTP, a sve ovo dovodi do pada memrojske funkcije (61,69). Najveći broj prekliničkih dokaza u odnosu na druge derivate MSCs imaju MSCs-Exo. Njihova efikasnost se ogleda kroz uticaj na sinapse i plastičnost i bez potrebe za transplatacijom MSCs, time što prenosemikroRNK, proteine, faktora rasta, koji stabilizuju neuronsko mikrookruženje. U studiji Cui i sar., korišćeni su MSCs-Exo i dobijeni iz hipoksično-prekondicioniranih MSCs, primenjeni na APP/PS1 transgene miševe, primećeno je smanjenje kognitivnog propadanja, paralelno sa poboljšanom sinapičkom funkcijom i regulisanim inflamatornim odgovorm, na osnovu čega se može zaključiti da MSCs-Exo doprinose očuvanju sinapsi (91). Ohrabrujući rezultati se odnose i na histološke parametre, al i na stvarne funkcionalne ishode, kao što su pamćenje i učenje, što doprinosi kvalitetu rezulta ovih prekliničkih studija (91). U studiji Losurdo i sar., u 3xTg-AD modelu je intranazalno primenjen MSCs derivatski EV/egzosomski preparat, pokazan je neuroprotektivni efekat i ublažavanje oštećenja sinaptičkih struktura, sa istovremenom imunomodulacijom mikroglije (77).Samim tim što su očuvane dendritske bodlje, kao i struktura sinpasi, može se zaključiti da terapija MSCs-Exo utiče na sinaptičku komponentu (77).

Pored sinapsi, neurogeneza u hipokampusu se u prekliničkim studijama često koristi kao pokazatelj reparativnog potencijala, jer je hipokampus centar memorijskih funkcija i region koji je među najranije pogođenim u AB. Postoji rastući broj prekliničkih radova koji ukazuju da MSCs-Exo mogu stimulisati markere neurogeneze i neuronske plastičnosti. U studiji Reza-Zaldivar i saradnika je prikazano da MSCs-Exo mogu doprineti oporavku kognitivne funkcije i stimulaciji neurogeneze u mišjem modelu AB (92).

5.2.2. Studije na životinjskim modelima ostalih neurodegenerativnih oboljenja-terapija MSCs derivatima

PB

U prekliničkim modelima PBMSCs derivati najčešće imaju antiinflamatorni i neuroprotektivni potencijal, bez zamene oštećenih dopaminenergičnih neurona. Poznato je da u osnovi PBse nalazi α-sinuklein agregacija, neuroinflamacija (mikroglija), oksidativni stres i mitohondrijalna disfunkcija, zbog čega ćemo efekte derivata analizirati kroz ta četiri pravca (10,32).

Najveći broj sprovođenih prekliničkih studija testirao je uticaj MSCs-EVs/MSC-Exo. Oni su pokazali sposobnost da utiču na mikrogliju i smanje stepen inflamacije u CNS-u (68). Ovaj efekat je bitan, jer kod PB bitniji uzročnik propadanja neurona je aktivirana mikroglija. U studiji Park i saradnika je pokazano da MSCs mogu povećati klirens α-sinukleina upravo kroz pomeranje mikroglije ka manje inflamatornom fenotipu (M2 polarizacija), što se povezuje sa ublažavanjem patološkog procesa karakterističnog za PB (68). Posebno interesantna ruta primene kod derivata i MSCs u PB je intranazalna aplikacija, jer omogućava relativno efikasan pristup CNS-u bez korišćenja invazivnih procedura. U modelima PB, Danielyan i saradnici su pokazali da intranazalno aplikovane MSCs mogu stići do CNS-a i ostvariti terapijski efekat u smislu poboljšanja neurološkog fenotipa, odnosno motoričkih simptoma, što je postalo osnova za dalje pretkliničke pokušaje primene MSCs-derivata intranazalno (50,51).

MSCs derivati, konkretno MSCs-Exo su pokazali uticaj na agregaciju α-sinukleina, koji je centralni proces PB. U prekliničkim studijama je uglavnom zapaženo da MSCs-Exo doprinose pojačanoj autofagiji i mikroglijalnom klirensu patološkog α-sinukleina, što umanjuje toksično opterećenje na dopaminenergične neurone (50,93). Park i saradnici su kroz istraživanje direktno povezali da prelazak mikroglije u M2 fenotip sa pojačanim uklanjanjem α-sinukleina , što predstavlja jedan od bitnijih prekliničkih dokaza, na uticaj samu osnovu bolesti (68).Pretkliničke studije derivata MSCs u PB modelima često prijavljuju očuvanje dopaminergičnih neurona *substantia nigra* i funkcije strijatuma, što se manifestuje kroz poboljšanu motoriku (93). Dok, oksidativni stres i mitohondrijalna disfunkcija, kao jako izraženi patofiziološki mehanizmi koji utiču na propadanje dopaminenergičnih neurona, reguju na terapiju derivatima MSCs. Derivati MSCs u prekliničkim modelima smanjuju oksidativno oštećenje, indirektno kroz smanjenje inflamacije, a direktno kroz aktivaciju antioksidativnih puteva (22,93). Jiang i saradnici opisuju da MSCs-bazirani derivati mogu doprineti obnavljanju mitohondrijalne funkcije putem antioksidativnih mehanizama i potencijalnog mitohondrijalnog transfera, što predstavlja važnu biologiju koja se uklapa u PB patogenezu (22).

ALS

Poznato je da je etiologija ALS heterogena, ali patološki uzroci su jasni i međusobno povezani. Mehanizmi koji se nalaze u osnovi ove bolesti su neuroinflamacija, oksidativni stres, mitohondrijalna disfunkcija, glutamatna ekscitotoksičnost, disregulacija proteostaze (agregacija protein), glijalna

difunkcija (astrocita i mikroglije), kao i periferni procesi na nivou neuromišićnih veza (94). Obzirom da sve veći broj istraživanja, koja se sprovode u zadnjih par godina ukazuju na parakrini efekat MSCs, a da pritom ne dolazi do zamene oštećenih neurona, otvorilo ne više prostora i entuzijazma za sprovođenje istraživanja koja ne koriste žive ćelije, takozvani "cell-free" pristupi (94). MSCs derivati, u kontekstu ovog oboljenja, seposmatraju kao modulatori patološkog mikrookruženja u CNS-u, time što poseduju antiinflamatorne i neuroprotektivne efekte, koji imaju sposobnost da uspore progresiju bolesti (94).

MSCs-Exosu najčešće istraživani MSCs derivati i patološkom procesu neurodegeneracije, zbog njihove izuzetne sposobnosti da postižu prenos funkcionalnih molekula (miRNK, protein, lipida) i uspevaju modlulirati ćelije CNS-a, a da pritom nije potrebna aplikacija živih ćelija (94). U istraživačkim radovima prekliničkih studija sprovedenih na ALS modelima, ističe se efikasna sposobnost derivata MSCs, konkretno MSCs-Exo, u neuroprotekciji, pre svega kroz smanjenje neuroinflamacije i moduliranjem glijalne aktivnosti. U SOD1G93A modelu, primena MSCs-Exo iz masnog tkiva dovela je do smanjenja reaktivne mikroglije i astrcita, ublažavanja degeneracije motornih neurona i usporavanja funkcionalnog propadanja (95).

MSCs-CM je složena mešavina rastvorljivih faktora, koje MSCs luče tokom kultivacije, a uključuje citokinine, hemokine, faktore rasta i druge bioaktivne molekule (95). Kao takav, MSCs-CM je dokaz da MSCs imaju terapijski potencijal i bez potrebe da sama ćelija preživi i integriše se u CNS (96). U prekliničkom eksperimentalnom radu Sun i saradnika pokazano je da MSCs-CM može ostvariti neuroprotektivne i imunomodulatorne efekte u ALS-relevantnim ćelijskim sistemima (primarne kulture motornih neurona, NSC-34 ćelije, astroglije i mikroglije), što potvrđuje da parakrini faktori MSCs direktno utiču na ključne patološke elemente ALS (96).

MSCs-Sec obuhvata ukupne parakrine proizvode MSCs, uključujući rastvorljive faktore (94). U ALS modelima, MSCs-Sec se smatra potencijalno korisnim, jer cilja više patoloških procesa istovremeno (inflamacija, oksidativni stres, glijalna toksičnost), što odgovara prirodi ALS (94).

HB

HB sa izuzetno kompleksnim mehanizmima u osnovi oboljenja, kao što su mitohondrijalna disfunkcija, oksidativni stres, poremećaj sinaptičke transmisije, neurinflamacija, smanjenje neurotrofične podrške, svizajedno dovode do gubitka neurona, a klinička slika se manifestuje motoričkim

poremećajima, kognitivnim opadanjem i psihijatrijskim simptomima (46,72,73). Obzirom na mnogobrojne mehanizme koji prouzrokuju ovo oboljenje, u poslednjih nekoliko godina prekliničkа istraživanja sve više se fokusiraju na "cell-free"terapije, odnosno na ispitivanja i MSCs derivata. Postoje mnogobrojni dokazi koji pokazuju parakrino dejstvo MSCs derivata (26,32).Uglavnom se isputuju MSCs-EVs/MSCs-Exo, MSCs-CM i šire definisan MSCs-Sec (26,32).

U određenim prekliničkim istraživanjima na HB modelima ustanovljeno je da MSCs-EVs su povezane sa smanjenjem inflamacije, antioksidativnim efektima, kao i neuroprotektivnim dejstvom u strijatumu. Ovaj efekat MSCs-EVs se zasniva na prenosu miRNK/proteina i modulaciji mikroglije. Ovo je od izuzetne važnosti, jer HB posebno se javlja osetljivost mitohondrija, izražen oksidativni stres i inflamacija (82).

U prekliničkim modelima HB postoje dokazi da MSCs-CM može da ublaži proces neurodegeneracije i neuroinflamacije. U R6/2 transgenom mišjem modelu HB, primena MSCs-CM dobijenog od humanih amnionskih MSCs (hAMSC) došlo je do blažih kliničkih simptoma i boljih funkcionalnih ishoda u odnosu na kontrolne životinje (97). Zabeleženo je i odlaganje pojave neuroloških simptoma, poboljšanje performansi na rotarodu i manji deficit motoričkih funkcija, dok su na nivou mozga registrovani manja striatalnaatrofija i smanjena formacija striatalnih intranuklearnih inkluzija. Posebno značajno, hAMSC je doveo do smanjenja aktivacije mikroglije i nižeg nivoa iNOS, što ukazuje da terapijski efekat može biti posredovan prvenstveno imunomodulacijom i ublažavanjem neuroinflamacije (97).

MS

U prekliničkim istraživanjima MS, istraživanja se sprovode na EAE modelu**,** koji adekvatnoreprodukuje ključne patološke procese MS, uključujući aktivaciju autoreaktivnih T limfocita, infiltraciju inflamatornih ćelija u CNS, neuroinflamaciju, demijelinizaciju i posledična neurološka oštećenja (58,78).Obzirom da je u poslednje vreme fokus sve više prebačen na istraživanju derivata MSCs, većinski broj istraživanja je ukazao na parakrini efekat derivata, bez direktne zamene oštećejnih ćelija (32,94). MSCs derivati su relevantni za izradu potencijalne terapije za MS, jer ciljaju imunološku komponentu bolesti (Th1/Th17, Treg, citokinski profil, migracija limfocita) i neurodegenerativnu komponentu (aktivacija mikroglije, oštećenje oligodendrocita, demijelinizacija i aksonska degeneracija)(79,83,94).

Najveći broj prekliničkih studija za MS među MSCs derivatima sproveden je za MSCs-Exo i EV-frakcije u modelima hronične i progresivne EAE, sa dominantnom inflamacijom i izraženim degenerativnim promenama (32,98). U ovim studijama je uočeno da MSCs-Exo mogu menjati

funkcionalno stanje imunskih ćelija, da smanje neuroinflamaciju i na taj način indirektno pružaju zaštitu mijelinu i aksonskim strukturama (32,98). Zapažen je i mehanizam aktiviranMSCs-EVs, koji u EAE modelima smanjuje proinflamatorne Th1 i Th17 odgovore i preusmerava imunski odgovor ka antiinflamatornom profilu, ujedno povećavajući Treg i smanjujući produkciju ključnih citokinina (IFN-γ i IL-17) (99). Sve ovo rezultira da inflamatorne ćelije u manjem broju prodiru u CNS, što ublažava kliničke simptome EAE (99). Od velikog značaja su radovi u kojima je pokazano da MSCs-EVs izolovanih iz masnog tkiva, imaju uticaj na migraciju T limfocita, što je pretstavlja bitan patološki proces kod MS, jer infiltracija autoreaktivnih limfocita aktivira proces demijelinizacije i neurodegeneracije (100). Laso-García i saradnici su pokazali da MSCs-EVs poreklom iz humanih MSC imaju terapijski potencijal u progresivnom fenotipu bolesti, jer MSCs-EVs mogu doprineti „smirivanju“ mikroglije i redukciji inflamatornih medijatora u CNS, što je jedna od težih modifikacija (98).

U poređenju sa MSCs-EVs, MSCs-CM je slabije standardizovan, ali važna komponenta “cell-free” terapije (94). Dahbour i saradnici u pregledu literature navode da su u neurodegenerativnim bolestima, uključujući MS/EAE modele, i MSCs i MSCs-CM povezani sa imunomodulacijom i neuroprotekcijom, kroz supresiju proinflamatornih odgovora i promociju reparativnog mikrookruženja u CNS (94). Međutim, u okviru EAE modela, MSCs-CM je čestoopisan kao terapija koja pokazuje efekte time što smanjenje inflamatorne citokine i posredno ublažava proces demijelinizacije (94). Ograničenje ovakvih studija povezanih sa kondicioniranim medijumom u MS modelima je da efikasnost je u direktnoj vezi sa izvorom MSCs, trajanja kondicioniranja i uslova kultivacije, pa sa time su rezultati varijabilni i teže uporedivi između studija, ali to ne umanjuje relevantnost MSCs-CM (92,94).

6. Kliničke studije

Kliničke studije se definišu kao sistematska istraživanja koja se izvode na ljudima, koji mogu biti zdravi dobrovoljci ili pacijenti, čiji je cilj procena bezbednosti, efikasnosti i određivanje optimalnog režima primene nekog određenog terapijskog pristupa. Prelazak iz prekliničkih u kliničke studije naziva se translacija, koja se zaniva na prelasku *in vitro*studija ili studija na životinjskim modelima, koje su se zasnivale na proceni bioloških efekata i osnovnih mehanizama delovanja, na studije koje imaju za cilj potvrdu da uočeni terapijski potencijal se može preneti u humani sistem u kontrolisanim uslovima i na bezbedan način (4,14,16). Kliničke studije se sastoje iz više faza, gde bi se nivo dokaza postupno povećavao. Rana faza ili faza I ima za cilj procenu bezbednosti, kao i spoznaju potencijalnih neželjenih efekata i procenu izvodljivosti primene. Cilj II faze je na preliminarnoj efikasnosti, određivanju optimalne doze i režima, dok faza III se fokusira na potvrdu efikasnosti u većim grupama pacijenata, poređenju sa standardnom terapijom i sprovodi se procena rizika i koristi. Kada se terapija odobri sledi faza IV tokom koje se prate dugoročne ishodi i bezbednost u realnim uslovima kliničke prakse (4,16). Kod studija koje koje koriste MSCs i MSCs derivate, kliničke studije analiziraju i kritične karakteristike studija, što predstavlja izvor ćelija, ruta primene, dozu i režim aplikacije i izbor primarnih i sekundarnih ishoda. Kod neurodegenerativnih oboljenja ishodi uključuju neurološke skale, kognitivne testove, funkcionalne parametre, biomarkere inflamacije i neurodegeneracije i "neuroimaging" metode (8,9,12,15,16). Dakle, kliničke studije imaju za cilj da utvrde dejstvo terapije, ali i procenjuju MSCs terapijske pristupe (4,6,8).

6.1. Kliničke studije primene MSCs kod AB

Pretkliničke studije su omogućile razvijanje kliničkih ispitivanja MSCs u AB, zahvaljujući dokazima koji su dobijeni u prekliničkim istraživanjima. Dokazi iz prekliničkih studija, koji su postavili osnovu za ispitivanja u kliničkim, su sposobnost MSCs da moduliraju patološko mikrookruženje CNS-a, pre svega kroz proces imunomodulacije, smanjenje neuroinflamacije, neuroprotekciju i parakrino delovanje (61,69). Specifično delovanje MSCs, u odnosu na standarne farmakološke terapije, koje ciljaju samo jedan patološki mehanizam, čini MSCs terapiju idealnom potencijalnom terapijom za neurodgenerativna oboljenja. Specifičnost delovanja MSCs se ogleda, upravo, u imunomodulatornom delovanju na više patoloških mehanizama koji leže u osnovi oboljenja(8,9,61). Naglasak u ranim

kliničkim fazama istraživanja MSCs kao potencijalne terapije, bio je u proceni bezbednosti, a kasnije tek na na signalima njene efikasnosti (9,61).

Kliničke studije MSCs terapije kod AB usmerene su na nekoliko bitnih činioca, odnodno, procenjuje se bezbednost i podnošljivost MSCs primene, prvenstveno zbog rizičnosti intrakranijalnih procedura, prate se kognitivni i funkcionalni ishodi, kao što su MMSE, ADAS-Cog i slične skale, prate se biomarkeri (u likvoru i periferiji), koji su pokazatelji biološkog efekta, kao i Aβ42, ukupni tau i fosforilisani tau (p-tau), kao i inflamatorni parametri (9,61). U studijama je od velike bitnosti izbor rute primene, obzirom, kada se MSCs sistemacki primenjuju, njihov prolaz kroz KMB je ograničen, zbog čega je došlo do razvoja drugih alternativnih načina aplikacije(39,40,101).

U kliničkim studijama AB najčešće su korišćene alogene MSCs populacije, razlog tome je standardizacija, dostupnost kao i mogućnost razvoja "of the shelf" terapije. Najviše podataka iz radova dostupno je za hUCB-MSCs, koje su korišćene u više kliničkih ispitivanja sa intrakranijalnom/intraventrikularnom aplikacijom (69,102). Ovaj izvor MSCs karakteriše stabilnost poliferativnog potencijala, relativno povoljnog imunološkog profila i translacionog iskustva (102). Iako se u neurodgenerativnim oboljenjima razmatra i klinička primena BM-MSCs i AD-MSCs, u dosadašnjim istraživanjima u vezi AB, najstabilniji kontinuitet istraživanja pokazale su istraživanja u kojima su se koristile hUCB-MSCs, ostavivši najveći trag u kliničkim studijama (9,61,102).

Ruta primene u kliničkim istraživanjima u AB je jedana od bitnijiih tema, obzirom da ima direktan utiacj na biodistribuciju i verovatnoću da MSCs postignu pozitivan efekat u CNS-u. Poznato je da sistemske rute, poput intraaterijske su lakše za izvođenje, ali ujedno pokazale su ograničeno prisustvo samih MSCs u moždanom paranheimu i obično bivaju zarobljenje u perifernim organima (61). Zato se najčešće u radovima izdvaja potencijalna prednost korišćenja stereotaktičke intraparenhimske aplikacijeMSCsu mozak i intracerebroventrikularne aplikacije u komore (direktan pristup CNS-u preko likvornog prostora) (102,103). Izbor neke od ovih ruta može povećati mogućnost da navedena ćelijska terapija utiče na neuroinflamaciju, mikroglijalno okruženje, ali shodno tome, nose i procedualne rizike, što objašnjava zašto su ove studije u I fazi, odnosno, u proceni bezbednosti (102,103).

Jedan od najznačajnijih kliničkih koraka u MSCs terapiji AB predstavlja faza I studija u kojoj suhUCB-MSCsstereotaktički injektovane direktno u mozak pacijenata sa dijagnozom AB. U ovom ispitivanju primarni cilj je bio bezbednost, uz praćenje neželjenih efekata, mogućnosti inflamatornog odgovora CNS-a i neurološkog statusa pacijenata. Studija je pokazala da se procedura generalno može izvesti uz prihvatljiv i bezbednosni način u okviru strogo kontrolisanih uslova, ali je naglašeno da su moguće lokalne reakcije/inflamatorni signali nakon aplikacije, što je omogućava planiranje režima doziranja i eventualnih ponovljenih aplikacija (102). Obzirom da u fazi I se ne može očekivati

pokzatelj efikasnosti u kotekstu kognitivnog oporavka, značajnost ove studije se ogleda u potvrdi translacione izvodljivosti direktne primene MSCs u CNS pacijenta sa AB (102).

Rađeno je istraživanje u fazi I, gde je važan korak bio na intracerebroventrikularnu primenu hUCB-MSCs, kojom je omogućen direktan kontakt MSCs sa CNS preko cerebrospinalne tečnosti, što u teoriji omogućava širu distribuciju faktora MSCs, kao i interakciju sa inflamatornim procesima u nervnom sistemu. U ovom istraživanju akcenat je bio na neželjenim efektima i praćenju preliminarnim biomarkerima (103). Rezultati studije pokazali su da intracerebroventrikularna ruta primene je izvodljiva, ali primećene su i tranzitorne inflamatorne reakcije nakon aplikacije, što se očekivalo (103). Pokazatelj ovog istraživanja je da MSCs terapija potencijalno aktivno utiče na neuroimuni sistem, ali potrebno je usavršavanje optimizacije doze i režima, jer dodatnapodsticaj inflamacije može imati kontradiktoran efekat kod AB (103).

Kognitivni parametri u fazi I uglavnom nisu u fokusu kao primarni efekat, ali se često prate kao sekundarni ishodi u cilju procene signala efikasnosti. Sagledavši sve obuhvatno, dostupni podaci za MSCs u AB, još uvek ne predstavljaju adekvatan i jasan dokaz za stabilno poboljšanje kognitivnih parametara, ali postoje pojedinačni pokazatelji da određeni pacijenti mogu pokazati usporavanje progresije ili blagepromene u tokom praćenja (9,61).

Kod postojećih kliničkih studija, akcenat je na bezbednosti primene MSCs, što podrazumeva monitoring neuroloških aplikacija, imaging praćenje (MRI), infekcije, sistematske neželjene reakcije (102,103). U kliničkim literaturama istaknuto je da se rute koje aplikuju MSCs direktno u CNS mogu sprovoditi, ali su potrebni pažljivi protokoli ustandardizovanim uslovima (9,61).

Klinička istraživanja MSCs terapije u AB još uvek su u ranoj fazi, ali predstavljaju značajan translacioni korak ka terapijama koje ciljaju neuroinflamaciju i mikrookruženje CNS-a. Najkonkretniji klinički dokazi do sada, odnose se na programe koji koriste hUCB-MSCs i direktnije rute primene u CNS (stereotaktička i intracerebroventrikularna aplikacija) i time je glavni zaključak da MSCs terapija može biti izvodljiva, ali da zahteva visoku standardizaciju i pažljivo praćenje neuroinflamatornih reakcija(102,103). Za procenu stvarne efikasnosti (disease-modifying efekta) neophodna su veća, kontrolisana klinička ispitivanja sa jasnim biomarkerima i kognitivnim endpointima, kao i poređenje optimalnih doza i režima ponovljenih aplikacija (9,61).

6.2. Kliničke studije primene MSCs kod ostalih neurodegenerativnih oboljenja

PB

Kliničke studije MSCs kao potencijalne terapije PB su manje brojne u odnosu na kliničke studije MS ili ALS. U poslednjih par godina interesovanja za klinička istraživanja MSCs terapije u PB su veća. Razlog porastu interesovanja leži u već poznatim imuno-modulatornim, antiinflamatornim i neurotrofičnim delovanjima MSCs, koja su savršen odgovor na neuroinflamaciju i oksidativni stres, koji su jedni od bitnih mehanizama koji su prisutni u osnovi PB, pored gubitka dopaminergičnih neurona (4,10,16).Sprovođena su do sada pretežno rana klinička ispitivanja, odnosno, faza I/II ili otvorena klinička ispitivanja, gde su najčešće korišćene autologne BM-MSCs ili hUCB-MSCs, sa različitim rutama primene, konkretno intravenska, intratekalna i intraarterijska (4,16).Slični patofiziološki mehanizmi su u osnovi i kod AB, ali se terapijski efekti MSCs u kliničkim studijama teđe prevode u jasno merljive kliničke ishode (16).

Jedna grupa kliničkih izveštaja i malih studija je pokazala da MSCs terapija kod PB može dovesti do funkcionalnog poboljšanja, koje je mereno UPDRS skalama i motornim testovima, uz prihvatljiv bezbednosni profil (4,14). Ovi rezultati se tumače kao preliminarni klinički efekti, s obzirom da ovi rezultati ne potiču iz randominizovanih kliničkih studija i kao takvi se ne mogu smatrati definitivnim dokazima (4).Trenutno se smatra na osnovu sprovedenih kliničkih studija da MSCs poseduju relativno dobru bezbednost u tretiranju PB, takođe, je pokazano usporavanje simptoma u podgrupama, ali jasan nedostatak je nedovoljna standardizacija, kao nedovoljan broj velikih RCT studija, slično kao i kod AB (4,16).Nasuprot tome, u kliničkim studijama kod AB, iako je takođe potvrđena bezbednost MSCs, terapije, efekti na kognitivne funkcije bivaju ograničeni i varijabilnizbog čega je češće praksa da se beleže promene u biomarkerima, nego jasna klinička poboljšanja (61).

ALS

Trenutno su MSCs kliničke studije najaktivnije upravo kod ALS oboljenja, jer sem što dolazi do degeneracije motonih neurona, bitan faktor u njihovom oštećenju je neuroinflamacija i glijalna disfunkcija, na šta MSCs terapija može da utiče modifikacijom tih procesa (10,16,37).Slični mehanizmi su prisutni i kod AB, međutim, efekti terapije se teže prevode u jasnije kliničke ishode (61).

U kliničkom kontekstu MSCs su ispitivane kroz intratekalnu primenu, nekad u kombinaciji sa intravenskom, a u nekim pritupima su ispitivane kroz specijalne MSCs proizvode, koji su stimulisani da

luče nurotrofične faktore (MSCs-NTF) (4,16). U ranim kliničkim studijama, odnosno studijama u fazi I/II, pokzano je da intratekalna primena MSCs kod ALS pacijenata je izvodljiva i relativno bezbedna. U određenim radovima zabeleženi su znaci usporavanja pada ALSFRS-R skale u ograničenim vremsnskim prozorima (4,16).Nasuprot tome, u kliničkim studijama kod AB, MSCs terapija je takođe pokazala povoljan bezbednosni profil, ali su efekti na kliničke ishode, prvenstveno kognitivne funkcije, bili manje primetni i manje konzistentni. Navedene razlike delimično su obrazložene prirodom bolesti, jer ALS ima bržu i linearniju progresiju koja shodno tome pokazuje uočljivije promene u funkcionalnim skalama, dok je kod AB progresija znatno sporija. Sveobuhvatno, u obe grupe oboljenja MSCs terapija pokazuje najveći potencijal u ranim fazama bolesti i kod pažljivo izabranih podgrupa pacijenata (4,10,16). Od posebnog značaja su studije u kojima je razvijen MSCs proizvod sa naglašenim sekretornim profilom neurotrofina (MSCs-NTF), koji je bio predmet većih kliničkih ispitivanja (4,16). Ono što predstavlja dominantan problem u kliničkim studijama kod ovog oboljenja, al ii kod AB je različitost kliničkih fenotipova, različitost u brzini progresije i različite faze bolesti u trenutku ulaska pacijenta u sudiju. Uprkos tome, pojedini radovi pokazuju da MSCs terapija može biti klinički relevantna u određenim podgrupama, pogotovu ako se primenjuje u ranijoj fazi bolesti uz praćenje markerima inflamacije (4,10,16). MSCs terapija nije dokazana kao standard kod ALS, ali ni kod AB, međutim u više kliničkih studija je pokazana njena bezbednost, funkcionalni efekat kod dela pacijenata i mehanistički je logična (4,10,16).

HB

Kliničke stdudije u HB, u odnosu na prethodno opisana oboljenja, su sprovedena u znatno manjem broju, a razlog tome leži u činjenici da je ovo oboljenje monogenskog porekla (mutacija HTT) gena, pa sa time fokus je bio usmeren na genetske i molekularne terapije (6,16). Ipak, postoji teorijska osnova da MSCs mogu biti od koristi u terapiji HB , jer mogu uticati na sekundarnu nuroinflamaciju, oksidativni stres, mitohondrijalnu difunkciju i gubitak nurotrofične podrške (6,46).

U dostupnim kliničkim istraživanjima, MSCs terapija je ispitivana pretežno kao rana bezbednosna procena, potencijalna neuroprotektivna intervencija, ali bez većih kontrolisanih studija sa evidentnom i jasnom efikasnišću, kao što je slučaj kod AB (16). Još uvek se MSCs terapija u vezi sa ovim oboljenjem smatra kao eksperimentalna, bez jakih kliničkih dokaza, prisutna u manjim studijama ili izveštajima (16).

MS

Pored AB, MS se vrlo ozbiljno razmatra kao oboljenje koje može uspešno da se leči terapijom MSCs, a razlog tome leži u tome da je MS fundamentalno imunološko-inflamatorno oboljenje, na koje može efkiasno da se primeni imunosupresivni i imunomodulatorni kapacitet MSCs (16,58,59,78,79).Za razliku od AB, gde je inflamacija sekundarni i složeno povezan proces, kod MS ona je centralni patofiziološki mehanizam, što pruža direktnije i merljivije terapijske efekte MSCs terapije (61).

Kod MS kliničkih studija MSCs, uglavnom se ispituje autologna terapija, koja koristi BM-MSCs, gde se obično koristi intravenska ili intratekalna primena. Česti fenotipovi koji se ispituju u MS studijama su SPMS ili PPMS, gde je terapijski efekat uglavnom ograničen (16). U određenim kliničkim studijama je pokazano da MSCs terapija u progresivnoj MS može dovesti do stabilizacije pojedinih funkcionalnih parametara, poboljšanja vizuelnih funkcija i neurofizioloških mera, a MSCs terapija umereno utiče i na markere aktivnosti bolesti (16).Dok u kliničkim stjama kod AB efekti MSCs terapije se manje primetni na kliničkom nivou i češći pokazatelji su promene u biomarkerima, bez konzitentnog funkcionalnog poboljšanja (61).

Efikasnost MSCs terapije u MS se zasniva na snižavanju inflamatorne aktivnosti, promeni patoloških T-ćelijskih odgovora i time što potencijalno podržava remijelinizaciju i zaštitu aksona (146,79,83). Zbog svega navedenog u MS kliničkim studijama se meri MRI aktivnost, EDSS, relapse, neurofiziološki testovi i biomarkeri inflamacije (16).Slično kao i kod AB je prisutan problem u heterogenosti pacijenata, kao i nedostatak standardizovanih protokola, ali su klinički ishodi u MS merljiviji i konzistentniji (61). Generalni zaključak na osnovu kliničkih radova je da MSCs u MS su relativno stabilnog bezbednosnog profila, poseduju najobjktivniju racionalnu efikasnost kroz imunomodulaciju, ali nedostatak je niska standardizacija (4,16).

6.3. Kliničke studije primene MSCs derivata kod AB

Klinička ispitivanja derivata MSCs u terapiji AB su apsolutno logičan nastavak istraživanja na MSCs terapiju, jer sve veći broj pozitivnih efekata MSCs se odnosi na parakrini uticaj samih MSCs (imunomodulacija, neurotrofna podrška i regulacija mikrookruženja)(8,9,10,61).Obzirom da MSCs-EVs/MSCs-Exo, MSCs-CM i MSCs-Sec predstavljaju "cell-free" terapiju, time poseduje bolji bezbednosni profil u odnosu na ćelijsku terapiju, kao i veću mogućnost standardizacije (10,12,26,32).Za razliku od prekliničkih dokaza za efikasnost MSCs-derivata u okviru terapije, klinički dokazi su znatno ograničeniji iz te oblasti i dominantno se zasnivaju na ranim fazama istraživanja (pilot, I/II faza), u kojima je primarni cilj procena bezbednosti i podnošljivosti, dok su efikasnost i biomarkeri sekundarni ishodi (8,9,12,28).

MSCs-EVs/MSCs-Exo su objektivno najidealniji kandidat za “cell-free” terapiju AB. Razlog tome leži u njihovoj funkcionalnosti, odnosno, mogućnosti da prenose ključne parakrine signale poreklom od MSCs, a to su antiinflamatorne mikroRNK, nurotrofne faktore i molekule, koji utiču na fenotip mikroglije i astocita (16).

Uprkos jakoj prekliničkoj osnovi, u slučaju AB, još uvek ne postoji dovoljan broj objavljenih kliničkih studija, koje bi potvrdile definitivnu efikasnost MSCs-EVs/MSCs-Exo, dok postojeći rezultati iz kliničkih studija predstavljaju “klinički trag” i dokaz koncepta, dok definitivni ishodi imaju predispoziciju da se pokažu u budućim istraživanjima (4,16). U literaturi često biva opisan problem u metodologiji: različite laboratorije koriste različite definicije MSCs-EVs/MSCs-Exo, različite protokole izolacije i karakterizacije, što direktno utiče na ponovljivost i poredivost studija, pa savremene smernice (ISEV/MISEV) ističu potrebu za standardizacijom i rigoroznijim opisom MSCs-EVs proizvoda pre ulaska u široku kliničku primenu (6).

Korišćenje sekretoma u MSCsterapiji AB ima logičku osnovu, zbog modulatornih svojstva neuroinflamacije, neuroprotektivnih svojstava u korist podrške neurona, zbog poboljšanja sinaptičke plastičnosti (4,16). Istraživanja u ovoj oblasti vezana za MSCs-Sec su manje prisutna u odnosu na MSCs-EVs,zbog varijabilnosti sastava u zavisnosti od izbora ćelija, protokola kultivacije, što sve otežava formiranje regulatorne standardizacije. Dostupni klinički podaci o AB i uticaju terapije bazirane na MSCs-Sec su znatno ograničeni, tako da, se većina dokaza oslanja na prekliničku osnovu i konceptualnu opravdanost (4,16).

MSCs-CM je izvor parakrinog delovanja MSCs, zbog sadržaja koji obuhvata rastvorljive faktore i potencijalno EVs frakciju, izuzevši žive ćelije. U teoriji prednost MSCs-CM je koristan, jer smanjuje inflamatorne signale i glijalnu aktivnost, moduliše oksidaivni stres i pruža neurotrofičnu podršku neuronima. Uprkos logičnoj teorijskoj osnovi, u kliničkim istraživanjima AB, MSCs-CM su slabo prisutni, razlog tome je problem sa standardizacijom i ograničena dostupnost humanih podataka. Shodno ovome, trenutno, ne postoji dovoljan broj radova, niti količina podataka koja bi argumentovala teorijski koncept efikasnosti MSCs-CM u terapiji AB, pritom se klinički razvoj više fokusira na testiranju EVs, zbog lakše karakterizacije (4,16).

6.4. Kliničke studije primene derivata MSCs kod ostalih neurodegenerativnih oboljenja

PB

U AB, razvoj MSCsderivata u kliničkom studijama je značajno ograničen u poređenju sa prekliničkim podacima. Većina publikovanih radova ukazuje da MSCs-EVs u životinjskim modelima mogu doprineti smanjenju neuroinflamacije, oksidativnog stresa i poboljšanju dopaminergičke funkcije, ali kliničke studije na ljudima koje bi potvrdile efikasnost MSCs derivata u PB su i dalje retke ili nedovoljno razvijene (rane faze/protokoli). Zbog toga se u ovom trenutku potencijal MSCs-EVs u PB u kliničkom domenu pre svega zasniva na translatabilnosti mehanističkih nalaza (antiinflamatorni i neurotrofni efekti), dok su definitivni klinički ishodi još uvek nedostupni ili nedovoljno potvrđeni u objavljenim ispitivanjima (4,16). Slična situacija je i kod AB, gde su preklinički rezultati obećavajući, bez jasnepotvrde u kliničkim studijama (28).

ALS

Za ALS postoji najviše kliničkog iskustva u okviru MSCs terapije uopšte, ali kada se posmatraju MSCs derivati, klinički dokazi su i dalje ograničeni. Review radovi naglašavaju da "cell-free" pristupi (MSCs-EVs, MSCs-Sec, MSCs-CM) imaju racionalalnu osnovu u ALS, zbog dominantne uloge neuroinflamacije i glijalne disfunkcije u progresiji bolesti, kao i mogućnosti da se putem parakrinih faktora utiče na mikrogliju, astrocite i motoneuronsku stabilnost. Međutim, u dostupnoj kliničkoj literaturi MSCs-CM je uglavnom razmatran kroz eksperimentalne i *in vitro* podatke, dok su kliničke studije sa MSCs-EVs u ALS još uvek nedovoljno zastupljeneda bi se formirao zaključak na osnovu efikasnosti. Stoga se u ALS kliničkom smislu MSCs derivati najčešće predstavljaju kao obećavajući sastav terapije AB, koji je u ranoj fazi razvoja, uz koji je potrebna standardizacija proizvodnje, kao i doziranje i izboro odgovarajućih biomarkera (4,16,96). Slična ograničenja prisutna sui u kliničkim studijama kod AB, uprkos bioloskoj utemeljenosti, još uvek ne postoje konzistentni klinički dokazi o efikasnosti MSCs derivata u tretiranju AB (28).

HB

U HB kliničke studije vezane za MSCs pristupe su generalno retke, a za MSCs derivate još oskudnije. Fokus terapijskih istraživanja u HB uglavnom je bio usmeren na genske i molekularne ciljeve, s obzirom da je priroda bolesti monogenskog tipa, dok su regenerativni pristupi (uključujući MSCs-

EVs/MSCs-Sec/MSCs-CM) ostali dominantno u prekliničkoj fazi. Review literatura ističe da MSCs derivati u principu mogu biti relevantni za HB, zbog potencijalnih efekata na mitohondrijalnu disfunkciju, oksidativni stres, sinaptičku podršku i inflamatorno mikrookruženje, ali klinički radovi koji potvrđuju efikasnost MSCs derivata u HB pacijenata nisu dovoljno dostupni da bi se izvodili zaključci o terapijskoj koristi (4,16). Slična problematika je prisutna i kod AB, kao i kod HB (28).

MS

MS je neuroimunološka bolest kod koje MSCs terapija ima najviše kliničkog istraživačkog prostora među neurodegenerativnim oboljenjima, ali se ta baza dokaza u najvećoj meri odnosi na živu ćelijsku terapiju, dok su MSCs derivati i dalje u ranoj fazi kliničkog razvoja. Review radovi ukazuju da MSCs-EVs mogu predstavljati privlačnu opciju, zbog potencijalno boljeg bezbednosnog profila, lakše standardizacije i izraženih imunomodulatornih mehanizama (uticaj na T ćelijske odgovore, citokinski profil i inflamatornu aktivnost). Ipak, u poređenju sa prekliničkim EAE modelima, klinička validacija MSCs-EVs/MSCs-Sec/MSCs-CM u MS ostaje ograničena, te se u humanoj literaturi MSCs derivati uglavnom tretiraju kao terapijski kandidat koji zahteva dodatna, veća i metodološki standardizovana ispitivanja sa jasno definisanim biomarkerima i kliničkim ishodima (4,16). Sličan obrazac ograničene kliničke validacije prisutan je i kod AB (28).

7. Diskusija

7.1. Kritička analiza rezultata

Rezultati koji su prikazani u ovom radu, izvedeni iz prekliničkih i kliničkih dokaza, pokazuju da MSCs i njihovi derivati su jedni od najperspektivnijih terapijskih strategija biološkog porekla u neurodgenerativnim bolestima, izrazito uAB (26,32).U savremenoj literaturi posebno je naglašena promena koncepcije, odnosno, da MSCs nemaju ulogu u zameni izgubljenih neurona direktnom diferencijacijom, već predstavljaju biološke "modulatore bolesti", čiji se pozitivani efekti ostvaruju preko parakrinih signala i regulacijom patološkog mikookruženja u CNS-u(32,61). Rezultati dobijeni u prekliničkim istraživanjima AB, koji se odnose na efekat MSCs i njihovih derivata u lečenju iste, su od naročite važnosti, jer potvrđuju da je moguće efikasno uticati na glavne patološke kaskade bolesti, kao što su Aβ opterećenje, neuroinflamacija, sinaptička disfunkcija i oksidativni stres, koje su povezane sa boljim kognitivnim ishodima u testovima učenja i pamćenja (61,90,91,92). Kritički gledano, dobijeni pozitivni rezultati najčešće su poreklom iz studija u kojima su korišćene rane faze patologije ili su korišćeni modeli koji u potpunosti ne reprodukuju heterogenost humane bolesti, na primer, koristili su se dominantno Aβ modeli, različite transgene linije i bila je različita brzina u progresiji bolesti. Zbog svega navedenog je otežano iz prekliničkih modela "preneti" efekte na pacijena u kliničkim istraživanjima (61,87). Iz svega ovoga proizilazi pitanje: A šta je tačno terapijski efektor MSCs? Obrativši pažnju na sprovedene studije u kojima su korišćene MSCs i na veliki broj radova koji se odnosi na derivate MSCs, može se izvesti zaključak da terapijski efekat MSCs se ne odnosi na samo prisustvo ćelija u CNS-u, već na signalne molekule koje MSCs izlučuju kroz MSCs-Sec, MSCs-CM i MSCs-EVs/MSCs-Exo (26,32). Činjenica koja stoji iza prethodno navdenog zaključka je da određeni derivati MSCs, pogotovo MSCs-EVs/MSCs-Exo postižu imunomodulatorne i neuroprptektivne efekte nezavisno od ćelijske terapije (88,90,91). U prekliničkim modelima AB, intracerebralna aplikacija MSCs-EVs je postigla smanjenje Aβ plakova u ranoj fazi bolesti, što je u direktnoj korelaciji sa idejom da MSCs-EVs mogu biti noseći terapijski faktor (90). Hipoksično-prekondicionirani MSCs-Exo u APP/PS1 modelu su pokazali potencijal u popravci sinaptičke disfunkcije i smanjenju inflamatornih odgovora, koje je pratilo smanjeno kognitivno propadanje (91).

Sa druge strane rezultati u MSCs-Sec terapije ukzuju da rastvorljive komponente mogu imati izražene reparativne efekte,ali uporedo sa time je i veća njihova varijabilnost (26,32). U vezi sa time, bitan dokaz dobijen u prekliničkim studijama, da intranazalna aplikacija MSCs-Sec modelu AB može da doprinese popravljanju moždanog mikrookruženja i dovede do funkcionalnog poboljšanja, što predstavlja jak akrgument koji opravdava MSCs-Sec kao potencijalnog terapijsog kandidata(89). U isto vreme, iz ovoga proizilazi pitanje: Koliko je terapijski efekat reproduktibilan, obzirom da je poznato

da sastav MSCs-Sec je uslovljen kultivacijom, starošću donora, izvorom MSCs i protokolom proizvodnje (26).

Poređenjem ćelijske terapije i "cell-free" terapije, izvodi se zaključak da MSCs derivati prednjače u nekoliko stvari, koje imaju direktan uticaj na kvalitet dokaza i na interpretaciju samih rezultata, a to je lakša standardizacija, mogućnost stabilnijeg skladištenja, preciznije doziranje, manji rizik od nekontrolisanog ponašanja ćelija nakon aplikacije (26,32). Ovi faktori bitno utiču na kliničku primenu, jer se ona ne zasniva samo na biološkom efektu, već su od važnosti i regulatorna i proizvodna održivost (26). Ovo je razlog zašto su MSCs-Exo za sada dosledno podržani derivati u literaturi koja se odnosi na AB, jer iza sebe imaju potporu sa najviše prekliničkih dokaza o antiinflamatornom dejstvu, neuroprotektivnim efektima i očuvanju sinapsi (90,91,92).

Kritiča analiza mora da uzme u obzir da efekat MSCs derivata, koji je dobijen u više studija nije usmeren na jedan patofiziološki mehanizam, već predstavlja sinhroniuticaj na više patoloških procesa (26,32). To se izdvaja kao velika prednost kod oboljenja koja su multifaktorskog porekla, kao što je AB, ali može biti ujedno i nedostatak, jer je otežano izdvananje primarnog mehanizma delovanja (61,87). Drugim rečima, iako se primećuje kognitivno poboljšanje, nije u potpunosti razjašnjen uticaj na Aβ klirens ili ipak potiče od sinergističkog delovanja ovih mehanizama (61,90,102).

Analizom kliničkih rezultata u AB, može se opaziti da je broj studija i dalje ograničen, kao i prisutna heterogenost protokola i činjenica da je fokus pretežno na bezbednosti i izvodljivosti, a u manjoj meri na efikasnost u kognitivnim ishodima (9,61). Zbog svega navedenog MSCs terapija se trenutno može psmatrati kao terapijski pristup, koji prate jaka biološka opravdanja sa obećavajućim prekliničkim dokazima, ali ujedno i nedovoljno potvrđenom kliničkom efikasnošću u smislu modifikacije toka bolesti (61,87).

Iako AB u najvećem fokusu dosadašnje literature o MSCs derivatima, rezultati za ostala neurodegenerativna oboljenja pružaju važne informacije o širini i ograničenjima "cell-free" pristupa. Kod PB, preklinički dokazi ukazuju da MSCs-derivati, naročito MSCs-EVs/MSCs-Exo, mogu da utiču na centralne patološke mehanizme bolesti, što uključuje neuroinflamaciju, mitohondrijalni stres i α-sinuklein patologiju, uz poboljšanja motoričkih ishoda u određenim eksperimentalnim modelima (93). Ipak, problem u interpretaciji je različitost u modelima PB sa rutom primene, što ujedno otežava poređenje i standardizaciju rezultata (26,93).

Kod ALS, MSCs derivati predstavljaju posebno zanimljiv pravac, jer bolest uključuje kompleksnu interakciju motornog neurona i mikroglije, dok inflamatorni i ekscitotoksični mehanizmi imaju dominantnu ulogu u progresiji. Preklinički radovi ukazuju da MSCs-CM može modulovati astrogliju i mikrogliju i smanjiti štetne inflamatorne procese, što pruža osnovu za unapređenje"cell-free"

terapijske strategije (96). Dodatno, MSCs-EVs/MSCs-Exo izolovanih iz adipoznog tkiva, pokazali su u modelu ALS potencijal da ublaže progresiju bolesti, što ide u korist hipotezi da efekat derivata može biti nezavisan od direktne prisutnosti ćelija u CNS-u (104).Ključni izazov u kritičkoj proceni rezultata jeste što većina dokaza dolazi iz SOD1 modela, dok ALS kod ljudi ima znatno širu etiološku i patofiziološku heterogenost (26).

Za HB, literatura o MSCs derivatima je znatno ograničenija u odnosu na AB i ALS, a veliki deo informacijaproističe iz šire interpretacije parakrinih efekata MSCs terapije i njihovog uticaja na oksidativni stres, mitohondrijalnu disfunkciju i inflamaciju u strijatumu (26). Zbog relativno manjeg broja prekliničkih studija koje izolovano ispituju MSCs-Sec/MSCs-CM/MSCs-EVs u HB modelima, trenutno nije moguće doneti čvrste zaključke o tome koji derivat daje najstabilnije efekte i koja ruta primene je optimalna (26).

Kod MS, “cell-free” terapija je teorijski atraktivna, jer je uzročnik bolesti prevashodno imunološki, pa su derivati MSCs potencijalno pogodni da postignu imunomodulatorni efekat sa manjim bezbednosnim rizikom u odnosu na ćelijske terapije(26).I ovde dominiraju dokazi iz EAE modela, dok su klinički dokazi za terapije bazirane na derivatima MSCs još uvek ograničeni, što ostavlja otvoren prostor za buduća istraživanja sa jasnom standardizacijom MSCs-EVs i MSCs-Sec preparata i definisanim imunološkim ishodima (26).

7.2. Poređenje nalaza pregleda literature sa postojećim istraživanjima i translacioni kontekst

Kada uporedimo raniji koncept regenerativne medicine sa savremenom literaturom o MSCs u oblasti neurodegenerativnih oboljenja, uočava se sve veći prelaz sa ideje o mogućnosti MSCs da zamene izgubljene neurone, ka idejimodulacije patološkog mikrookruženja. Drugačije rečeno, MSCs predstavljaju ćelije koje imaju sposobnost parakrinog uticaja na patološko mikrookruženje, a spsobosnost zamene izgubiljenih neurona i integracije u CNS (10,16,32). Savremena perspektiva pruža racionalno objašnjenje zašto je u poslednjoj deceniji intezivnije razvijena “cell-free” terapija, odnosno terapija zasnovana na derivatima MSCs, kao što su MSCs-EVs/MSCs-Exo, MSCs-CM, MSCs-Sec .Kada napravimo poređenje sa ćelijskom terapijom, MSCs derivati se ističu jasnim translacionim prednostima, odnosno pružaju bolju standardizaciju i kontrolisanje doze, lakše skladištenje, mogućnost ponavljanog doziranja (26,32,86,87).

Fokusirajući se na AB, poređenje rezultata sa postojećim istraživanjima, jasno je da AB predstavlja najrazvijeniji i najkonzistentniji translacioni okvir za MSCs terapije u neurodgeneraciji. Ovo nije

zaključak koji proizilazi iz učestalosti ovog oboljenja, niti same demencije kao posledice, koja je jedan od poznatijih zdravstvenih problema, već zato što na patološke mehanizme koji su osnovi AB, derivati MSCs mogu delovati (poremećaj sinaptičke plastičnosti, oksidativni stres, hronična neuroinflamacija, glijalna disfunkcija i poremećaj klirensapatoloških proteina) (8,9,10,61,87). U poređenju sa drugim neurodegenerativnim bolestima, klinička istraživanja MSCs u AB su metodološki raznovrsnija, sa većim fokusom na dizajn studija i parametre bezbednosti, dok se ishodi efikasnosti i dalje tretiraju kao preliminarni. Razlika između AB i drugih oboljenja je što se istovremeno razvija ćelijski i derivatni pristup, pa shodno tome, može se pratiti prelazak sa prekliničkih dokaza ka kliničkim istraživanjima (9,26,32,61).Od važnosti je istaći da se u kliničkom studijama AB najveći deo dosadašnjih pokušaja MSCs terapije vezuje za programe zasnovane na hUCB-MSCs, koji za sada predstavljaju najstabilniji i pravac kliničkih istraživanja u ovoj oblasti (9,61).U isto vreme sve je veći fokus na pristup zasnovan na derivatima MSC, koji u translacionom smislu postaje posebno značajan, jer ima za cilj da zadrži glavne mehanističke prednosti MSCs terapije, pre svega parakrino delovanje i modulaciju patološkog mikrookruženja, ali uz potencijalno manju složenost, bolju kontrolu i veću standardizaciju u odnosu na primenu živih ćelija (26,32,105).

U PB, dostupna literatura ukazuje da je povećano interesovanje za kliničku evaluaciju MSCs terapijskih pristupa, ali su klinički dokazi i dalje skromniji u poređenju sa AB i posebno MS (4,10,16). Razlozi su višestruki. Iako PB ima značajnu neuroinflamatornu i oksidativnu komponentu, klinička slika bolesti i dinamika progresije često zahtevaju dugotrajno praćenje kako bi se terapijski efekti mogli pouzdano registrovati. U ranim fazama translacije MSCs pristupa, većina kliničkih studija prvenstveno procenjuje bezbednost, dok se potencijalni signali efikasnosti uglavnom prate kroz funkcionalne skale, poput UPDRS, koje su korisne, ali ograničene u registrovanju suptilnih promena bolesti u kratkim vremenskim okvirima (4,10,16). Za razliku od AB, gde se u kliničkim istraživanjima ističe stabilnost programa, koji koriste odeđeni tip MSCs, PB kliničke studije češće uključuju heterogenu primenu različitih izvora ćelija, na primer BM-MSCs ili hUC-MSCs kao i različite rute primene (intravenozno, intratekalno, intraarterijski) (4,16). Ovakva raznolika metodologija otežava direktna poređenja između studija i usporava standardizaciju rezultata. Ipak, preliminarni nalazi ukazuju na prihvatljiv bezbednosni profil MSCs pristupa, uz mogućnost postojanja funkcionalnog poboljšanja kod određenog broja pacijenata, iako odsustvo velikih randomizovanih studija ostaje glavno ograničenje za donošenje čvrstih translacionih zaključaka (4,16). Kada se posmatraju MSCs derivati u PB, klinička validacija je još u ranijoj fazi, pa se translacioni zaključci trenutno oslanjaju na pretkliničke dokaze (4,16,26,32).

ALS u poređenju sa PB i HB predstavlja jedno od najaktivnijih kliničkih polja za MSCs terapiju, generalno (10,16,37). Ovakva situacija verovatno proizilazi iz izrazito teške prognoze ALS,

ograničenih terapijskih opcija, kao i jasnog uticaja neuroinflamacije, glijalne disfunkcije i toksičnog mikrookruženja u progresiji bolesti (10,16,37). ALS je bolest o kojoj se već kroz više kliničkih pokušaja može govoriti o ranom kliničkom iskustvu sa MSCs terapijom.Međutim, kada se fokus usmeri na MSCs derivate, translacioni kontekst ostaje nedovoljno razvijen. Iako teorijska osnova ima racionalni i logičan pristup (parakrini efekti, imunomodulacija, modulacija mikroglije i astrocita i neuroprotektivna podrška motoneuronima), kliničke studije koje direktno ispituju MSCs-EVs/MSCs-Exo ili MSCs-Sec kod ALS pacijenata još uvek nisu dovoljno zastupljene da bi se izveo zaključak o efikasnosti (4,16). Zbog toga se u literaturi ALS često ističe kao oboljenje koje ima jak terapijski potencijal korišćenjem MSCs, ali i kao primer bolesti u kojoj je posebno naglašena potreba za standardizacijom "cell-free" pristupa, razvojem biomarkera i definisanjem jasnih protokola doziranja i praćenja terapijskog odgovora (4,16).

HB predstavlja specifičan translacioni slučaj u poređenju sa AB, PB i ALS. S obzirom na to da je HB monogensko oboljenje, terapijski pravci u kliničkim istraživanjima tradicionalno su bili usmereni ka molekularnim i genskim strategijama, dok su regenerativni pristupi ostali uglavnom ograničeni na preklinički nivo (4,16). Iako preklinička logika podržava mogućnost da MSCs derivati pozitivno utiču na oksidativni stres, mitohondrijalnu disfunkciju, sinaptičku stabilnost i inflamatorno mikrookruženje u HB, klinički radovi koji potvrđuju njihovu efikasnost u populaciji pacijenata trenutno nisu dovoljno dostupni (4,16).

Za razliku od HB, MS predstavlja oboljenje sa najrazvijenijim koje ima potencijal za klinička istraživanja, koja koriste MSCs kao bazu terapije (4,16,61).Obzirom da je MS neuroimunološka bolest, a MSCs poseduju snažan imunomodulatorni potencijal i mogu direktno uticati na patogene mehanizme koji su aktivni u MS (4,16,61).Od važnosti je istaći da se najveći deo kliničkih podataka odnosi na ćelijsku terapiju, dok MSCs derivati još uvek ostaju u ranoj fazi kliničkog razvoja (4,16).U postojećoj literaturi MSCs-EVs/MSCs-Exo se sve češće opisuju kao potencijalno pogodna terapija za MS, prvenstveno zbog mogućnosti preciznije standardizacije i potencijalno povoljnijeg bezbednosnog profila u odnosu na ćelijsku terapiju (4,16).Iako su preklinički dokazi, posebno u EAE modelima, snažni, klinički dokazi još uvek dovoljno jaki, zbog čega se trenutna translaciona pozicija MSCs derivata u MS, može se opisati kao obećavajuća, ali još nedovoljno klinički potvrđena (4,16,26).

Na osnovu poređenja sa postojećim istraživanjima, može se zaključiti da MSCs i njihovi derivati imaju logičku teoretsku osnovu u formiranju potencijalne terapije za neurodegenerativne bolesti, jer potencijalno utiču na više patoloških mehanizama istovremeno (inflamacija, oksidativni stres, sinaptička disfunkcija, endogeni reparativni procesi) (8,9,10,32,61). Ipak, translacija u kliničkoj praksi nije ravnomerna među bolestima. AB ostaje okvir u kojem paralelno napreduju i ćelijski i derivatni

pristupi, PB i ALS su u ranih kliničkimistraživanjima uz nedovoljnu standardizaciju, HB predstavlja oboljenje sa izraženim translacionim deficitom, dok MS ima najjaču kliničku MSCs bazu, ali ograničenu kliničku evaluaciju derivata (4,16,26,61).

Zajednički zaključak dostupne literature jeste da se najveća translaciona vrednost MSsC terapije, a naročito MSCs derivata se nalazi u njihovoj sposobnosti da modulišu patološko mikrookruženje, smanje inflamatorne i oksidativne pritiske, stabilizuju sinaptičku funkciju i pospeše endogene procese reparacije (26,32,105). Ipak, da bi se ovaj potencijal pouzdano preneo u kliničku praksu, neophodne su metodološki stroge studije sa jasno definisanim protokolima proizvodnje, karakterizacije, doziranja i praćenja terapijskog odgovora, kao i razvoj adekvatnih biomarkera koji mogu premostiti barijeru između eksperimentalnih i kliničkih rezultata (26,32,105).

7.3. Ograničenja studija i rada

Iako dostupni preklinički i klinički podaci ukazuju na potencijal MSCs i njihovih derivata u formiranju terapije za neurodegenerativna oboljenja, da bi se formirao zaključak treba uzeti u obzir i ograničenja postojećih istraživanja, kao i ograničenja ovog rada koji je zasnovan na pregledu literature (4,8,9). Jedno od glavnih ograničenja prekliničkih studija jeste razlika između životinjskih modela i humane bolesti. Životinjski modeli često ne odražavaju u potpunosti složenost patogeneze i kliničkki tok oboljenja kod ljudi. U slučaju AB, najčešće korišćeni modeli reprodukuju amiloidnu patologiju, dok mnogi aspekti bolesti (heterogenost pacijenata, komorbiditeti, spor tok progresije) nisu adekvatno izraženi (8,9). Zbog toga uspešni preklinički rezultati ne garantuju isti terapijski efekat u kliničkim studijama (8,9,61). Dodatno ograničenje predstavlja izražena heterogenost između prekliničkih radova. Studije se razlikuju prema tipu i poreklu MSCs, uslovima kultivacije, načinu dobijanja derivata, kao i metodama izolacije i karakterizacije preparata (26,32,105). Takođe, doze i način izražavanja doze derivata nisu ujednačeni, zbog čega poređenje rezultata između radova često nije moguće (26,32,105). Važan problem predstavlja i distribucija ćelija nakon primene, pogotovo kod sistemskih ruta. Intravenozna i intraarterijska primena tehnički bivaju najjednostavnije, ali je u više radova pokazano da MSCs imaju nedovoljno prisustvo u moždanom parenhimu i da se značajan deo ćelija biva zadržan u perifernim organima (39,53,61,106). To utiče na slabiju ili varijabilnu efikasnost i otežava standardizaciju terapijskog pristupa (26,77,88).U kliničkim studijama ograničenja su još izraženija. Većina dostupnih kliničkih radova o neurodegenerativnim oboljenjima uključuje mali broj ispitanika i najčešće pripada ranim fazama (I/II), gde je primarni cilj procena bezbednosti, dok su efekti na efikasnost sekundarni i često slabo potvrđeni (4,9,16). Takođe, postoje razlike u izvoru

MSCs (BM-MSCs,AD-MSCs, hUCB-MSCs), rutama primene, dozama i režimu aplikacije, što dodatno otežava poređenje nalaza između studija (4,9,16). Što se tiče MSCs derivata, klinički dokazi su trenutno u manjem broju. Iako preklinički podaci pružaju dobru osnovu za translaciju, broj kliničkih studija koje direktno ispituju MSCs-EVs/MSCs-Exo, MSCs-Sec ili MSCs-CM još uvek nije dovoljan za donošenje pouzdanih zaključaka o efikasnosti (4,16,26,32). Dodatni problem predstavlja i potreba za regulatornim i metodološkim standardima u proizvodnji i karakterizaciji MSCsderivata, kako bi bila moguće poređenje rezultata (4,16).

Ograničenja ovog master rada su zasnovana na pregledu literature, bez sprovođenja originalnog eksperimentalnog istraživanja. Zaključci su, samim tim, uslovljeni kvalitetom i dostupnošću objavljenih studija, kao i njihovom međusobnom uporedivošću (4,8,9).Sem toga, postoji mogućnost da pojedini relevantni radovi nisu uključeni zbog ograničene dostupnosti punog teksta ili ograničenja pretrage baza podataka. Važno je naglasiti da neurodegenerativne bolesti predstavljaju heterogenu grupu oboljenja, sa značajnim razlikama u patogenezi i kliničkom toku. Zbog toga se ne može očekivati uniforman terapijski odgovor, već efekti MSCs terapije i MSCs derivata verovatno zavise od stadijuma bolesti, dominantnih patoloških mehanizama i individualnih karakteristika pacijenata (8,9,10,61).Zbog toga, dalja istraživanja trebalo bi da budu usmerena na standardizaciju protokola, razvoj biomarkera terapijskog odgovora i na dizajn studija koji omogućava realnu procenu uticaja terapije na tok bolesti (4,16,26,32).

8. Zaključak

8.1. Sažetak najvažnijih nalaza

U ovom master radu urađen je pregled i sinteza dostupnih prekliničkih i kliničkih dokaza o terapijskom potencijalu MSCs i izdvojeno njihovih derivata (MSCs-EVs/MSCs-Exo, MSCs-Sec i MSCs-CM) u cilju lečenja neurodegenerativnih oboljenja. Centralna ideja master rada se odnosi na MSCs terapijske pristupe koji imaju potencijal da utiču na više patoloških mehanizama istovremeno, što uključuje neuroinflamaciju, okidativni stres, sinaptičku disfunkciju, poremećaje proteostaze i promene mikrookruženja u CNS-u. Uprkos postojanju snažne preklinčke osnove, kao i velikog broja eksperimentalnih podataka, potvrda njihove efikasnosti u kliničkom domenu je još uvek ograničena (8,9,10). U slučaju AB, ključni nalaz pregleda literature se bazira na tome da je najveći deo kliničkog razvoja MSCs terapije u praksi usko povezan sa istraživanjima zasnovanim na hUCB-MSCs, gde pupčana vrpca važi za najstabilniji i najpoznatiji izvor MCSs (9,61). Racionalni pristup ovog pravca se ogleda kroz kombinaciju imunomodulatornih i funkcionalnih efekata MSCs na neuronsku mrežu, što je od važnosti za multifaktorskuprirodu AB (61,87). Klinička ispitivanja koja su do sada sprovedena i uočeni preliminarni podaci o bezbednosti u slučaju AB, pokazuju evidentni nesklad između očekivanih rezultata u smislu efekta opravdanog mehanizmima delovanja i nivoa potvrđene kliničke efikasnosti kroz standardizovane kliničke ishode i biomarkere (26,61). Drugi bitan nalaz u AB se odnosi povećanju translacionog značaja derivata MSCs, kao terapije koja ne koristi žive ćelije i time zaobilazi brojna ograničenja, odnosno “cell-free” terapija. Pregled literature je pokazao da prednost MSCs terapije je posledica parakrinog delovanja iste. Shodno tome, su derivati MSCs očekivani nastavak razvoja MSCs terapije (26,32,105). Cilj ovog pristupa je zadržavanje biološki korisnih efekata MSCs (imunomodulacija, neurotrofna podrška, regulacija patološkog mikrookruženja), a da se pritom zaobiđu otežavajuće okolnosti, poput složene primene živih ćelija i otežane standardizacije, a poveća bezbednost (26,32,105). Iako su preklinički rezultati primene MSCs-EVs veoma ohrabrujući, klinički rezultati o efikasnosti derivata MSCs u humanoj populaciji su još uvek ograničeni ili dolaze iz ranih faza istraživanja, gde se pretežno bezbednost procenjuje. Zbog svega navedenog, zaključci koji se odnose na efikasnost i samu delotvornost MSCs derivata, kao potencijalne terapije, se oprezno donose, uz gotovo uvek naglašenu potrebu za metodološki rigoroznijim i međusobno uporedivim kliničkim studijama (26,32,105).

U PB, pregled literature je pokazao porast u broju istraživanja koja koriste MSCs terapiju, ali istovremeno pokazuje metodološku heterogenost, ako usporedimo sa istraživanjima AB ili MS (4,10,16). Za ovo postoji više razloga, jedan od njih je sama priroda kliničkih ishoda u PB, jer procena progresije bolesti i terapijskoh odgovora obično iziskuje više vremena i duže praćenje, dok su rane studije u fazi

procene bezbednosti i eventualno funkcionalnih promena, koje obično bivaju merene skalama, poput UPDRS (4,16). Preklinički nalazi idu u korist ideji o potencijalu MSCs derivata u lečenju PB, pogotovo kroz efikasni uticaj na neuroinflamaciju, oksidativni stres i sinaptičku funkciju. Obzirom da se klinička validacija rezultata u PB još uvek nalazi u ranoj fazi, translacioni zaključci su bazirani na prekliničkim rezultatima in a pregledu radova (93,94).

ALS je u literature navedena kao jedna od najaktivnijih bolesti za testiranje MSCs terapije, a razlog tome je njena teška prognoza, kao i ograničena terapijska mogućnost, a ujedno značajnu ulogu u njenoj patogenezi imaju neuroinflamacija i glijalna disfunkcija (10,16,37). Kao i u slučaju prethodno navedenih oboljenja, klinička istraživanja su i kod ALS u ranoj fazi, odnosno usmerena na bezbednost i signale koji bi pokazali usporavanje progresije bolesti kod određenih pacijenata (10,16). Što se tiče MSCs derivata, postojana je jasna biološka osnova za njihovu primenu i efikasnost u lečenju, koja se zasniva na parakrinom delovanju, modulaciji mikroglije i astrocita i neuroprotektivnoj podršci. Uprkos ovome, broj kliničkih studija koji direktno ispituju efikasnost MSCs-EVs ili MSCs-Sec kod pacijenata obolelih od ALS, još uvek je nedovoljan da bi mogao da se formira neosporiv zaključak o njihovoj efikasnosti (96,104). Shodno navedenom, ALS se u literature opisuje kao indikacija sa značajnim terapijskim potencijalom za korišćenje MSCs terapije, ali ujedno izraženom potrebom za standardizacijom proizvoda, definisanjem pouzdanih biomarkera odgovora i jasnijim kriterijumima selekcije pacijenata u budućim studijama koje će koristiti MSCs derivate(26,104).

U ovom radu se HB izdvaja kao ona koju prati translaciono ogrničenje u primeni MSCs derivata. Upečatljiv razlog je njeno monogensko zasnovano na mutaciji HTT gena i većina kliničkih istraživanja svoj fokus je usmerila na genske terapije i molekularna istraživanja, dok regenrativni pristupi su se pretežno zadržali u prekliničkoj fazi (6,16,46). Uprkos prekliničkim nalazaima koji opisuju potencijalnu uspešnost MSCs derivata u regulisanju oksidativnog stresa, mitohondrijalne disfunkcije i kao sinaptičke podrške i utičući pozitivno na inflamatorno okruženje, trenutno ne postoji dovoljno kliničkih studija koje bi sve ovo potvrdile (6,16,46). Ovaj primer je pokazatelj da translacija MSCs derivata u kliničkoj praksi nije samo uslovlljena biološkom opravdanošću, već i istraživačkim prioritetima (46).

Kod MS, analiza literature je pokazala da je ovo oboljenje najviše ispitano u kliničkim studijama, koje su koristile MSCs terapiju, prvenstveno zbog izražene imunološke komponenete bolesti i dobro dokumentovanog imunomodulatornog dejstva MSCs (58,59,78). Najviše kiničkih podataka kod ovog oboljenja odnosi se na ćelijsku terapiju, sa fokusom na bezbednost, izvodljivost i potencijalne znake stabilizacije bolest, a MSCs derivati su još uvek nedovoljno klinički dokumentovani (16,61). Uprkos isticanju MSCs-EVs kao potencijalnog kandidata za tretman MS, zbog mogućnosti bolje

standardizacije i povoljnijeg bezbednosnog profila u odnosu na korišćenje živih ćelija, klinički dokazi ne prate obim prekliničkih nalaza (26,99,100,102).

Analizirajući sve bolesti skupa, može se zapaziti zajednički obrazac, koji se odnosi na razliku između dokaza o bezbednosti i dokaza o efikasnosti. U većini kliničkih studija, posebno u ranim fazama, primarni cilj je procena bezbednosti i podnošljivosti terapije, dok se efikasnost procenjuje sekundarno, često u studijama ograničene veličine i uz značajnu različitost protokola i proizvoda,izraženije kod MSCs derivata (26,32). Kada se zbirno posmatra, MSCs terapija i njihovi derivati poseduju biološki jaku osnovu kao i perspektivne terapijske pristupe za lečenje neurodegenerativnih bolesti. Međutim, broj i nivo kliničkih istraživanja niti je dovoljan, niti adekvatan da bi se sproveli kvalitetni postojani zaključci bazirani na klinički ispitanoj efikasnosti MSCs terapije. Kao ključni naredni koraci izdvajaju se stroža standardizacija proizvodnje i karakterizacije derivata, precizno definisani režimi doziranja i rute primene, kao i uključivanje pouzdanih biomarkera (u likvoru i plazmi, markeri neuroinflamacije i neurodegeneracije, neuroimaging) uz funkcionalne kognitivne i motorne ishode, kako bi se smanjio jaz između prekliničkih i kliničkih rezultata (26,32).

8.2. Naučni i stručni doprinos rada

Ovaj rad pruža sistematizovan i kritički integrisan pregled savremenih saznanja o primeni MSCs i njihovih derivata u terapiji neurodegenerativnih oboljenja, sa posebnim fokusom na AB, ali i na PB, ALS, HB i MS. Naučni doprinos rada ogleda se u objedinjavanju velikog broja prekliničkih i kliničkih nalaza u jedinstven translacioni okvir, koji omogućava adekvatno razumevanje realnog terapijskog potencijala MSCs i njihovih derivata u složenim, multifaktorskim bolestima CNS-a (61,76). Poseban doprinos rada jeste jasno razdvajanje i paralelna analiza ćelijske MSCs terapije i terapije zasnovane na MSCs derivatima, gde se može jasno zapaziti povoljni efekti MSCs ispoljeni kroz parakrino dejstvo. U ovom slučaju se MSCs-EVs, MSCs-Sec i MSCs-CMse mogu posmatrati kao racionalna terapijska osnova koja zadržava sve prednosti MSCs, a ujedno se može primeniti uz manju složenost u odnosu na ćelijsku terapiju (26,100,105). Rad dalje doprinosi boljem razumevanju multimehanističke prirode MSCs terapije, ističući da MSCs i njihovi derivati deluju istovremeno na više patoloških procesa karakterističnih za neurodegenerativna oboljenja, uključujući neuroinflamaciju, oksidativni stres, sinaptičku disfunkciju, poremećaje proteostaze i disbalans ćelijskog mikrookruženja. Ovakav pristup predstavlja pomak u odnosu na tradicionalne pristupe, koji se baziraju na jedan molekularni cilj, što se uklapa u savremene koncepte terapija za neurodegenerativna oboljenja (106,107). Stručni doprinos rada se ogleda kroz poređenje prekliničkih i kliničkih istraživanja. Rad jasno pokazuje da

preklinički radovi pokazuju imunomodulatore, neuroprotektivne i reparativne efekte MSCs i njihovih derivata, klinički dokazi još uvek zaostaju za njima (26,106). Dodatna vrednost rada leži u komparativnom sagledavanju različitih neurodegenerativnih oboljenja, pri čemu se pokazuje da translacioni potencijal MSCs terapije ne zavisi samo od biološke opravdanosti, već i od istraživačke infrastrukture, dostupnosti kliničkih kohorti i prioriteta naučne zajednice u okviru pojedinih bolesti. Time rad nije usresređen samo na biološke analize, već uvodi i širi kontekst kliničkog razvoja i translacione medicine (6,16,26,106). I još jedan bitan doprinos se odnosi na razumevanje MSCs derivata, kao potencijalne sledeće faze u razvoju regenerativne terapije u neurologiji. Ujedno naglašavajući potrebe za standardizacijom proizvodnje, karakterizacijom proizvoda, koji bi trebalo biti u skladu sa međunarodnim smernicama za ekstracelularne vezikule i formiranju pouzdanih biomarkera terapijskog odgovora. Ovim bi se mogla postaviti osnova koja bi mogla prevazići ograničenja između eksperimentalnih nalaza i terapijske primene (106,108).

8.3. Ograničenja rada i preporuke za buduća istraživanja

Ovaj rad ima karakter preglednog istraživanja, zbog čega su zaključci zasnovani na dostupnoj literaturi, a ne na sopstvenim eksperimentalnim ili kliničkim podacima. Jedno od glavnih ograničenja predstavlja heterogenost studija koje su analizirane, uključujući razlike u izvorima MSCs, metodama izolacije i karakterizacije derivata, doziranju, rutama primene i izboru kliničkih ishoda. Shodno ovome, otežano je poređenje rezultata i formiranje zaključaka koji bi bili pouzdani, a tiču se efikasnosti MSCs terapije, kao i terapije njihovim derivatima u lečenju neurodegenerativnih bolesti (26,32). Dodatno ograničenje odnosi se na činjenicu da je veliki deo dokaza o efikasnosti zasnovan na prekliničkim modelima, dok su kliničke studije, posebno vezane za MSCs derivate, još uvek malobrojne i često fokusirane na bezbednost, a ne na pokazatelje terapijske efikasnosti. Zbog toga je translacija eksperimentalnih nalaza za rutinsku kliničku praksu i dalje ograničena (26,32).Buduća istraživanja treba da budu usmerena ka standardizaciji proizvodnje i karakterizacije MSCs derivata, definisanju optimalnih doza i ruta primene, kao i uključivanju pouzdanih biomarkera odgovora na terapiju. Poseban značaj ima sprovođenje većih, kontrolisanih i metodološki ujednačenih kliničkih studija koje bi omogućile jasniju procenu efikasnosti ovih terapijskih pristupa u različitim fazama neurodegenerativnih oboljenja (26,32).

9. LITERATURA

1. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. 1968;6(2):230–247

2. Gadhave DG, Sugandhi VV, Jha SK, Nangare SN, Gupta G, Singh SK, et al. Neurodegenerative disorders: mechanisms of degeneration and therapeutic relevance. Ageing Res Rev. 2024;99:102357

3. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. Cytotherapy. 2006;8(4):315–317

4. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. Cell Transplant. 2016;25(5):829–848. doi:10.3727/096368915X689622

5. GBD 2021 Nervous System Disorders Collaborators. Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. Lancet Neurol. 2024;23(4):344–381. doi:10.1016/S1474-4422(24)00038-3

6. Lamptey RNL, Chaulagain B, Trivedi R, Gothwal A, Layek B, Singh J. A review of the common neurodegenerative disorders: current therapeutic approaches and the potential role of nanotherapeutics. Int J Mol Sci. 2022;23(3):1851

7. Angeloni C, Malaguti M, Prata C, Freschi M, Barbalace MC, Hrelia S. Mechanisms underlying neurodegenerative disorders and potential neuroprotective activity of agrifood by-products. Antioxidants (Basel). 2023;12(1):94. doi:10.3390/antiox12010094.

8. Hu J, Wang X.Alzheimer's disease: from pathogenesis to mesenchymal stem cell therapy – bridging the missing link. Front Cell Neurosci. 2022;15:811852. doi:10.3389/fncel.2021.811852

9. Regmi S, Liu DD, Shen M, Kevadiya BD, Ganguly A, Primavera R, et al. Mesenchymal stromal cells for the treatment of Alzheimer's disease: Strategies and limitations. Front Mol Neurosci. 2022;15:1011225. doi:10.3389/fnmol.2022.1011225

10. Gonçalves RGJ, Vasques JF, da Silva-Junior AJ, Gubert F, Mendez-Otero R. Mesenchymal stem cell- and extracellu-lar vesicle-based therapies for Alzheimer's disease: progress, advantages, and challenges. Neural Regen Res. 2023;18(8):1645–1651. doi:10.4103/1673-5374.361546

11. Zhang J, Zhang Y, Wang J, Xia Y, Zhang J, Chen L. Recent advances in Alzheimer's disease: mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2024;9(1):211. doi:10.1038/s41392-024-01911-3.

12. Wang X, Zhou Y, Gao Q, Yang M, Deng Y, Zhan Z. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in Alz-heimer's disease: a novel cell-free therapeutic strategy and diagnostic biomarker. Int J Nanomedi-cine. 2025;20:14375–14391. doi:10.2147/IJN.S556625

13. Dugger BN, Dickson DW. Pathology of neurodegenerative diseases. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017;9(7):a028035. doi:10.1101/cshperspect.a028035

14. Deng S, Xie H, Xie B. Cell-based regenerative and rejuvenation strategies for treating neurodegenerative diseases. Stem Cell Res Ther. 2025;16(1):167. doi:10.1186/s13287-025-04285-7

15. Palanisamy CP, Pei J, Alugoju P, Anthikapalli NVA, Jayaraman S, Veeraraghavan VP,et al. New strategies of neurodegenerative disease treatment with extracellular vesicles (EVs) derived from mesenchymal stem cells (MSCs). Theranostics. 2023;13(12):4138–4165. doi:10.7150/thno.83066

16. Sivandzade F, Cucullo L. Regenerative stem cell therapy for neurodegenerative disorders: an overview. Int J Mol Sci. 2021;22(4):2153

17. Krsek A, Baticic L. Nanotechnology-driven therapeutic innovations in neurodegenerative disorders: a focus on Alzheimer's and Parkinson's disease. Future Pharmacol. 2024;4(2):20. doi:10.3390/futurepharmacol4020020

18. Wei M, Yang Z, Li S, Le W. Nanotherapeutic and stem cell therapeutic strategies in neurodegenerative diseases: a promising therapeutic approach. Int J Nanomedicine. 2023;18:611–626. doi:10.2147/IJN.S395010

19. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells: a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. Cell Commun Signal. 2011;9:12. doi:10.1186/1478-811X-9-12

20. Sofroniew MV. Astrocyte reactivity: subtypes, states, and functions in CNS innate immunity. Trends Immunol. 2020;41(9):758–770. doi:10.1016/j.it.2020.07.004.

21. Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – an ISEV position paper. J Extracell Vesicles. 2015;4:30087. doi:10.3402/jev.v4.30087

22. Liu Q, Zhang X, Zhu T, Xu Z, Dong Y, Chen B. Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells: mechanisms and functions. Mitochondrion. 2024;79:101950. doi:10.1016/j.mito.2024.101950

23. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Exp Hematol. 2003;31(10):890–896. doi:10.1016/S0301-472X(03)00110-3

24. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. Transplantation. 2003;75(3):389–397. doi:10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9

25. Wong RSY, Tan EW, Goh BH. Mesenchymal stem cell-based therapies: challenges and en-hancement strategies. Cell Biochem Biophys. 2025. doi:10.1007/s12013-025-01895-z

26. Mello DB, Mesquita FCP, Silva dos Santos D, Asensi KD, Dias ML, Campos de Carvalho AC, et al. Mesenchymal stromal cell-based products: challenges and future perspectives. Int J Mol Sci. 2024;25(11):6063. doi:10.3390/ijms25116063

27. Patel T, Henna F, Sharif I, Javed I, Mustafa F, Sharif H, et al. A narrative review on the therapeutic potential of stem cells in neurodegenerative diseases: advances, insights, and challenges. Ann Med Surg (Lond). 2025;88:1441 1453. doi:10.1097/MS9.0000000000004490

28. Isik S, Osman S, Yeman Kiyak B, ShamshirSRM, SanchezNME. Advances in neurodegenerative disease therapy: stem cell clinical trials and promise of engineered exosomes. CNS Neurosci Ther. 2025;31(9):e70577. doi:10.1111/cns.70577

29. Kumar M, Ray S, Sil S. Stem cell derived extracellular vesicles in neurodegeneration and neuroaging: therapeutic potential and challenges. Extracell Vesicles Circ Nucl Acids. 2025;6(3):594–608. doi:10.20517/evcna.2025.65

30. Yin T, Liu Y, Ji W, Feng Y, Li W, Zhang H, et al. Engineered mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles: a state of the art multifunctional weapon against Alzheimer's disease. Theranostics. 2023;13(4):1264–1285. doi:10.7150/thno.81860

31. Vizoso FJ, Eiro N, Costa L, Esparza P, Landin M, Diaz Rodriguez P, et al. Mesenchymal stem cells in homeostasis and systemic diseases: hypothesis, evi-dences, and therapeutic opportunities. Int J Mol Sci. 2019;20(15):3738. doi:10.3390/ijms20153738

32. Phinney DG, Pittenger MF. Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy. Stem Cells. 2017;35(4):851–858. doi:10.1002/stem.2575

33. Driscoll J, Patel T. The mesenchymal stem cell secretome as an acellular regenerative therapy for liver disease. J Gastroenterol. 2019;54(9):763–773. doi:10.1007/s00535-019-01599-1

34. Ye Y, Gao M, Shi W, Gao Y, Li Y, Yang W, et al. The immunomodulatory effects of mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles in Alzheimer's disease. Front Immunol. 2024;14:1325530. doi:10.3389/fimmu.2023.1325530

35. Phinney DG, Di Giuseppe M, Njah J, Sala E, Shiva S, St Croix CM, et al. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. Nat Commun. 2015;6:8472. doi:10.1038/ncomms9472

36. Liew LC, Katsuda T, Gailhouste L, Nakagama H, Ochiya T. Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles: a glimmer of hope in treating Alzheimer's disease. Int Immunol. 2017;29(1):11–19. doi:10.1093/intimm/dxx002

37. Fogarty MJ. Driven to decay: excitability and synaptic abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res Bull. 2018;140:318–333. doi:10.1016/j.brainresbull.2018.05.023

38. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood–brain barrier. Nat Med. 2013;19(12):1584–1596. doi:10.1038/nm.3407.

39. Daneman R, Prat A. The blood–brain barrier. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015;7(1):a020412. doi:10.1101/cshperspect.a020412

40. Montagne A, Nation DA, Sagare AP, Barisano G, Sweeney MD, Chakhoyan A, et al. APOE4 leads to blood–brain barrier dysfunction predicting cognitive decline. Nature. 2020;581(7806):71–76. doi:10.1038/s41586-020-2247-3

41. Erickson MA, Banks WA. Blood–brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. J Cereb Blood Flow Metab. 2013;33(10):1500–1513. doi:10.1038/jcbfm.2013.135

42. Chia YC, Anjum CE, Yee HR, Kenisi Y, Chan MKS, Wong MBF, Pan SY. Stem cell therapy for neurodegenerative diseases: how do stem cells bypass the blood brain barrier and home to the brain? Stem Cells Int. 2020;2020:8889061. doi:10.1155/2020/8889061

43. Sheng M, Sabatini BL, Südhof TC. Synapses and Alzheimer's disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012;4(5):a005777. doi:10.1101/cshperspect.a005777

44. Bridi JC, Hirth F. Mechanisms of α-synuclein-induced synaptopathy in Parkinson's disease. Front Neurosci. 2018;12:80. doi:10.3389/fnins.2018.00080

45. Henstridge CM, Pickett E, Spires-Jones TL. Synaptic pathology: a shared mechanism in neurological disease. Ageing Res Rev. 2016;28:72–84. doi:10.1016/j.arr.2016.04.005.

46. Raymond LA, André VM, Cepeda C, Gladding CM, Milnerwood AJ, Levine MS.Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function. Neuroscience. 2011;198:252–273. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.08.052

47. Chen T, Dai Y, Hu C, Lin Z, Wang S, Yang J, et al. Cellular and molecular mechan-isms of the blood brain barrier dysfunction in neurodegenerative diseases. Fluids Barriers CNS. 2024;21:60. doi:10.1186/s12987 024 00557 1

48. Pintér P, Alpár Á. The role of extracellular matrix in human neurodegenerative diseases. Int J Mol Sci. 2022;23(19):11085. doi:10.3390/ijms231911085

49. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol. 2008;8(9):726–736. doi:10.1038/nri2395

50. Danielyan L, Schäfer R, von Ameln-Mayerhofer A, Buadze M, Geisler J, Klopfer T, et al. Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson disease. Rejuvenation Res. 2011;14(1):3–16. doi:10.1089/rej.2010.1130.

51. Danielyan L, Beer-Hammer S, Stolzing A, Schäfer R, Siegel G, Fabian C, et al. Intranasal delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, macrophages, and microglia to the brain in a transgenic model of Parkinson's disease. Cell Transplant. 2014;23(Suppl 1):S123–S139. doi:10.3727/096368914X684970

52. Eggenhofer E, Luk F, Dahlke MH, Hoogduijn MJ. The life and fate of mesenchymal stem cells. Front Immunol. 2014;5:148.

53. Lee NK, Yang J, Chang EH, Park SE, Lee J, Choi SJ, et al. Intra-arterially delivered mesenchymal stem cells are not detected in the brain parenchyma in an Alzheimer's disease mouse model. PLoS One. 2016;11(5):e0155912. doi:10.1371/journal.pone.0155912

54. Shin JY, Park HJ, Kim HN, Oh SH, Bae JS, Ha HJ, et al. Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase β-amyloid clearance in Alzheimer disease models. Autophagy. 2014;10(1):32–44. doi:10.4161/auto.26508

55. Oh SH, Kim HN, Park HJ, Shin JY, Lee PH. Mesenchymal stem cells increase hippocampal neurogenesis and neuronal differentiation by enhancing the Wnt signaling pathway in an Alzheimer's disease model. Cell Transplant. 2015;24(6):1097–1110

56. Vercelli A, Mereuta OM, Garbossa D, Muraca G, Mareschi K, Rustichelli D, et al. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Dis. 2008;31(3):395–405

57. Marconi S, Bonaconsa M, Scambi I, Squintani GM, Rui W, Turano E, et al. Systemic treatment with adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates clinical and pathological features in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Dis. 2013;60:20–34. doi:10.1016/j.nbd.2013.08.006.

58. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. Blood. 2005;106(5):1755–1761. doi:10.1182/blood-2005-04-1496

59. Rafei M, Campeau PM, Aguilar Mahecha A, Buchanan M, Williams P, Birman E, et al. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cell responses. J Immunol. 2009;182(10):5994–6002. doi:10.4049/jimmunol.0803962

60. Pound P, Ritskes-Hoitinga M. Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. J Transl Med. 2018;16:304.

61. Ou M, Zhang Y, Chen L, et al. Mesenchymal stem cells: a new direction for the treatment of Alzheimer's disease. Front Aging Neurosci. 2024;16:1388441. doi:10.3389/fnagi.2024.1388441'

62. Lee JK, Jin HK, Endo S, Schuchman EH, Carter JE, Bae JS. Intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta deposition and rescues memory deficits in Alzheimer's disease mice by modulation of immune responses. Stem Cells. 2010;28(2):329–343. doi:10.1002/stem.277

63. Lee HJ, Lee JK, Lee H, Carter JE, Chang JW, Oh W, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve neuropathology and cognitive impairment in an Alzheimer's disease mouse model through modulation of neuroinflammation. Neurobiol Aging. 2012;33(3):588–602. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.024

64. Kim S, Kim DH, Lee D, Chang EH, Kim JH, Hwang JW, et al. The preventive and therapeutic effects of intravenous human adipose-derived stem cells in Alzheimer's disease mice. PLoS One. 2012;7(9):e45757. doi:10.1371/journal.pone.0045757

65. Ma T, Gong K, Ao Q, Yan Y, Song B, Huang H, et al. Intracerebral transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells alternatively activates microglia and ameliorates neuropathological deficits in Alzheimer's disease mice. Cell Transplant. 2013;22(Suppl 1):S113–S126. doi:10.3727/096368913X672181

66. Kim DH, Lee D, Chang EH, Kim JH, Hwang JW, Kim JY, et al. GDF-15 secreted from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells delivered through the cerebrospinal fluid promotes hippocampal neurogenesis and synaptic activity in an Alzheimer's disease model. Stem Cells Dev. 2015;24(20):2378–2390. doi:10.1089/scd.2014.0487

67. Misra S, Chopra K, Saikia UN, Sinha VR, Sehgal R, Modi M,et al.. Effect of mesenchymal stem cells and galantamine nanoparticles in rat model of Alzheimer's disease. Regen Med. 2016;11(7):629–646. doi:10.2217/rme 2016 0032

68. Park HJ, Oh SH, Kim HN, Jung YJ, Lee PH. Mesenchymal stem cells enhance α synuclein clearance via M2 microglia polarization in experimental and human parkinsonian dis-order. Acta Neuropathol. 2016 Nov;132(5):685–701. doi:10.1007/s00401 016 1605 6

69. Suzuki M, McHugh J, Tork C, Shelley B, Hayes A, Bellantuono I, et al. Direct muscle delivery of mesenchymal stem cells reduces denervation and prolongs survival in a transgenic model of amyotrophic lateral sclerosis. Mol Ther. 2008;16(12):2002–2010. doi:10.1038/mt.2008.197

70. Dey ND, Bombard MC, Roland BP, Davidson S, Lu M, Rossignol J, et al. Genetically engineered mesenchymal stem cells reduce behavioral deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. J Neurosci. 2010;30(28):10090–10100. doi:10.1523/JNEUROSCI.0963-10.2010

71. Uccelli A, Milanese M, Principato MC, Morando S, Bonifacino T, Vergani L, et al. Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis. Mol Med. 2012;18:794–804. doi:10.2119/molmed.2011.00498

72. Lin YT, Chern Y, Shen CKJ, Wen HL, Chang YC, Li H, et al. Human mesenchymal stem cells prolong survival and ameliorate motor deficit through trophic support in Huntington's disease mouse models. PLoS One. 2011;6(8):e22924. doi:10.1371/journal.pone.0022924

73. Denu RA, Hematti P. Effects of oxidative stress on mesenchymal stem cell biology. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:2989076. doi:10.1155/2016/2989076

74. Rossignol J, Fink K, Davis K, Clerc S, Crane A, Matchynski J, et al. Transplants of adult mesenchymal and neural stem cells provide neuroprotection and behavioral sparing in a transgenic rat model of Huntington's disease. Stem Cells. 2014;32(2):500–509. doi:10.1002/stem.1508

75. Bantubungi K, Blum D, Cuvelier L, Wislet Gendebien S, Rogister B, Brouillet E, et al. Stem cell factor and mesenchymal and neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease. Mol Cell Neurosci. 2008;37(3):454–470. doi:10.1016/j.mcn.2007.11.001

76. Lee ST, Chu K, Park JE, Jung KH, Im WS, Lim HC, et al. Slowed progression in models of Huntington's disease by adipose stem cell transplantation. Ann Neurol. 2009;66(5):671–681. doi:10.1002/ana.21795

77. Chen YA, Lu CH, Ke CC, Chiu SJ, Jeng FS, Chang CW, et al. Mesenchymal stem cell derived exosomes ameliorate Alzheimer's disease pathology and improve cognitive deficits. Biomedicines. 2021;9(6):594. doi:10.3390/biomedicines9060594

78. Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, Musio S, Bonanni I, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalo-myelitis. Ann Neurol. 2007;61(3):219–227. doi:10.1002/ana.21076

79. Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, et al. Human bone marrow–derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. Glia. 2009;57(11):1192–1203. doi:10.1002/glia.20841

80. Kassis I, Grigoriadis N, Gowda Kurkalli B, Mizrachi Kol R, Ben Hur T, Slavin S, et al. Neuro-protection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoim-mune encephalomyelitis. Arch Neurol. 2008;65(6):753–761. doi:10.1001/archneur.65.6.753

81. Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. Stem Cells. 2009;27(10):2624–2635. doi:10.1002/stem.194

82. D'Agostino VG, Elia CA, Massenzio F, Lonati E, Mauri M, Rizzi L, et al. Extracellular vesicles of mesenchymal stromal cells can be taken up by microglial cells and partially prevent the stimulation induced by β-amyloid. Stem Cell Rev Rep. 2022;18(3):1113–1126. doi:10.1007/s12015-021-10261-4

83. Bai L, Lennon DP, Caplan AI, DeChant A, Hecker J, Kranso J, et al. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell induced recovery in multiple sclerosis models. Nat Neurosci. 2012;15:862–870. doi:10.1038/nn.3109

84. Zhang Y, Kim MS, Jia B, Yan J, Zuniga-Hertz JP, Han C, et al. Hypothalamic stem cells con-trol ageing speed partly through exosomal miRNAs. Nature. 2017;548(7665):52–57. doi:10.1038/na-ture23282

85. Malm T, Loppi S, Kanninen KM. Exosomes in Alzheimer's disease. Neurochem Int. 2016;97:193–199. doi:10.1016/j.neuint.2016.04.011

86. Abrishamdar M, Jalali MS, Yazdanfar N. The role of exosomes in pathogenesis and the thera-peutic efficacy of mesenchymal stem cell derived exosomes against Parkinson's disease. Neurol Sci. 2023;44(7):2277 2289. doi:10.1007/s10072 023 06706 y

87. Ou CM, Xue WW, Liu D, Ma L, Xie HT, Ning K. Stem cell therapy in Alzheimer's disease: current status and perspectives. Front Neurosci. 2024;18:1440334. doi:10.3389/fnins.2024.1440334

88. Cone AS, Yuan X, Sun L, Duke LC, Vreones MP, Carrier AN, et al. Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles ameliorate Alzheimer's disease like phenotypes in a preclinical mouse model. Theranostics. 2021;11(17):8129–42. doi:10.7150/thno.62069

89. Santamaria G, Brandi E, La Vitola P, Grandi F, Ferrara G, Pischiutta F, et al. Intranasal delivery of mesenchymal stem cell secretome repairs the brain of Alzheimer's mice. Cell Death Differ. 2021;28(1):203–218. doi:10.1038/s41418-020-0592-2

90. Elia CA, Tamborini M, Rasile M, Desiato G, Marchetti S, Swuec P, et al. Intracerebral injection of extracellular vesicles from mesenchymal stem cells exerts reduced Aβ plaque burden in early stages of a preclinical model of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2019;78:278–287. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2019.02.015

91. Cui GH, Wu J, Mou FF, Xie WH, Wang FB, Wang QL, et al. Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cells ameliorate cognitive decline by rescuing synaptic dys-function and regulating inflammatory responses in APP/PS1 mice. FASEB J. 2018;32(2):654–668

92. Reza-Zaldivar EE, Hernández-Sapiéns MA, Gutiérrez-Mercado YK, Sandoval-Ávila S, Gomez-Pinedo U, Márquez-Aguirre AL, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote

neurogenesis and cognitive function recovery in a mouse model of Alzheimer's disease. Neural Regen Res. 2019;14:1626–1634

93. He S, Wang Q, Chen L, Wang X, Qu S, Wang Y, et al. miR 100a 5p enriched exosomes de-rived from mesenchymal stem cells enhance the anti oxidant effect in a Parkinson's disease model via regulation of Nox4/ROS/Nrf2 signaling. J Transl Med. 2023;21:747. doi:10.1186/s12967 023 04638 X

94. Dahbour S, Jamali F, Alhattab D, Al-Radaideh A, Ababneh O, Al-Ryalat N, et al. Mesenchymal stem cells and conditioned media in the treatment of multiple sclerosis patients: clinical, ophthalmological and radiological assessments of safety and efficacy. CNS Neurosci Ther. 2017 Nov;23(11):866–874. doi: 10.1111/cns.12759. PMID: 28961381

95. Bonafede R, Turano E, Scambi I, Busato A, Bontempi P, Virla F, et al. ASC-Exosomes ameliorate the disease progression in SOD1(G93A) murine model underlining their potential therapeutic use in human ALS. Int J Mol Sci. 2020 May 21;21(10):3651. doi: 10.3390/ijms21103651. PMID: 32455791. PMCID: PMC7279464

96. Sun H, Bénardais K, Stanslowsky N, Thau-Habermann N, Hensel N, Huang D, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells and MSC conditioned medium in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)—in vitro evidence from primary motor neuron cultures, NSC-34 cells, astrocytes and microglia. PLoS One. 2013;8(9):e72926. doi:10.1371/journal.pone.0072926

97. Giampà C, Alvino A, Magatti M, Silini AR, Cardinale A, Paldino E, et al. Conditioned medium from amniotic cells protects striatal degeneration and ameliorates motor deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. J Cell Mol Med. 2019;23(2):1581–1592. doi:10.1111/jcmm.14113

98. Laso-García F,Ramos-Cejudo J, Carrillo-Salinas FJ, Otero-Ortega L, Feliú A, Gómez-de Frutos M, et al. Therapeutic potential of extracellular vesicles derived from human mesenchymal stem cells in a model of progressive multiple sclerosis. PLoS One. 2018;13:e0202590

99. Jafarinia M, Alsahebfosoul F, Salehi H, Eskandari N, Azimzadeh M, Mahmoodi M,et al. Therapeutic effects of extracellular vesicles from human adipose-derived mesenchymal stem cells on chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. J Cell Physiol. 2020;235:8779–8790

100. Farinazzo A, AngiariS, TuranoE, Bistaffa E, DusiS, RuggieriS, et al. Nanovesicles from adipose-derived mesenchymal stem cells inhibit T lym-phocyte trafficking and ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. Sci Rep. 2018;8:7473

101. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. Nat Rev Neurol. 2018;14(3):133–150. doi:10.1038/nrneurol.2017.188

102. Kim H, Seo SW, Chang JW, Lee JI, Kim CH, Chin J, et al. Stereotactic brain injection of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in patients with Alzheimer's disease dementia: a phase 1 clinical trial. Alzheimers Dement (N Y). 2015;1(2):95–102. doi:10.1016/j.trci.2015.06.007

103. Kim HJ, Cho KR, Jang H, Lee NK, Jung YH, Kim JP, et al. Intracerebroventricular injection of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in patients with Alzheimer's disease demen-tia: a phase I clinical trial. Alzheimers Res Ther. 2021;13:154. doi:10.1186/s13195-021-00897-2

104. Gschwendtberger T, Thau-Habermann N, von der Ohe J, Luo T, Hass R, Petri S. Protective effects of EVs/exosomes derived from permanently growing human MSC on primary murine ALS motor neurons. Neurosci Lett. 2023;816:137493. doi:10.1016/j.neulet.2023.137493. PMID: 37774774

105. Losurdo M, Pedrazzoli M, D'Agostino C, Elia CA, Massenzio F, Lonati E, et al. Intranasal delivery of mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles exerts immunomodulatory and neu-

roprotective effects in a 3xTg model of Alzheimer's disease. Stem Cells Transl Med. 2020;9(9):1068–1084. doi:10.1002/sctm.19 0327

106. Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. Cell Stem Cell. 2018;22(6):824–833. doi:10.1016/j.stem.2018.05.004

107. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. NPJ Regen Med. 2019;4:22. doi:10.1038/s41536-019-0083-6

108. Witwer KW, Ci Goberdhan D, O'Driscoll L, Théry C, Welsh JA, Blenkiron C, et al. Updating MISEV: Evolving the minimal requirements for studies of extracellular vesicles. J Extracell Ve-sicles. 2021 Dec;10(14):e12182. doi:10.1002/jev2.12182. PMID: 34953156

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Извештај о урађеном завршном (мастер) раду

Наслов рада	Примена мезенхималних матичних ћелија и њихових деривата у терапији неуродегенеративних болести са посебним фокусом на Алцхајмерову болест
Кандидат	Вујовић Александра
Ментор	Проф. др Биљана Љујић
Чланови комисије	*1.* Проф. др Владимир Јањић , *председник* *2.* Проф. др Биљана Љујић, *ментор и члан* *3.* Доц. Татјана Бошковић Матић, *члан*

Циљ истраживања, истраживачка питања или хипотезе и методологија истраживања (до 2000 каратера)

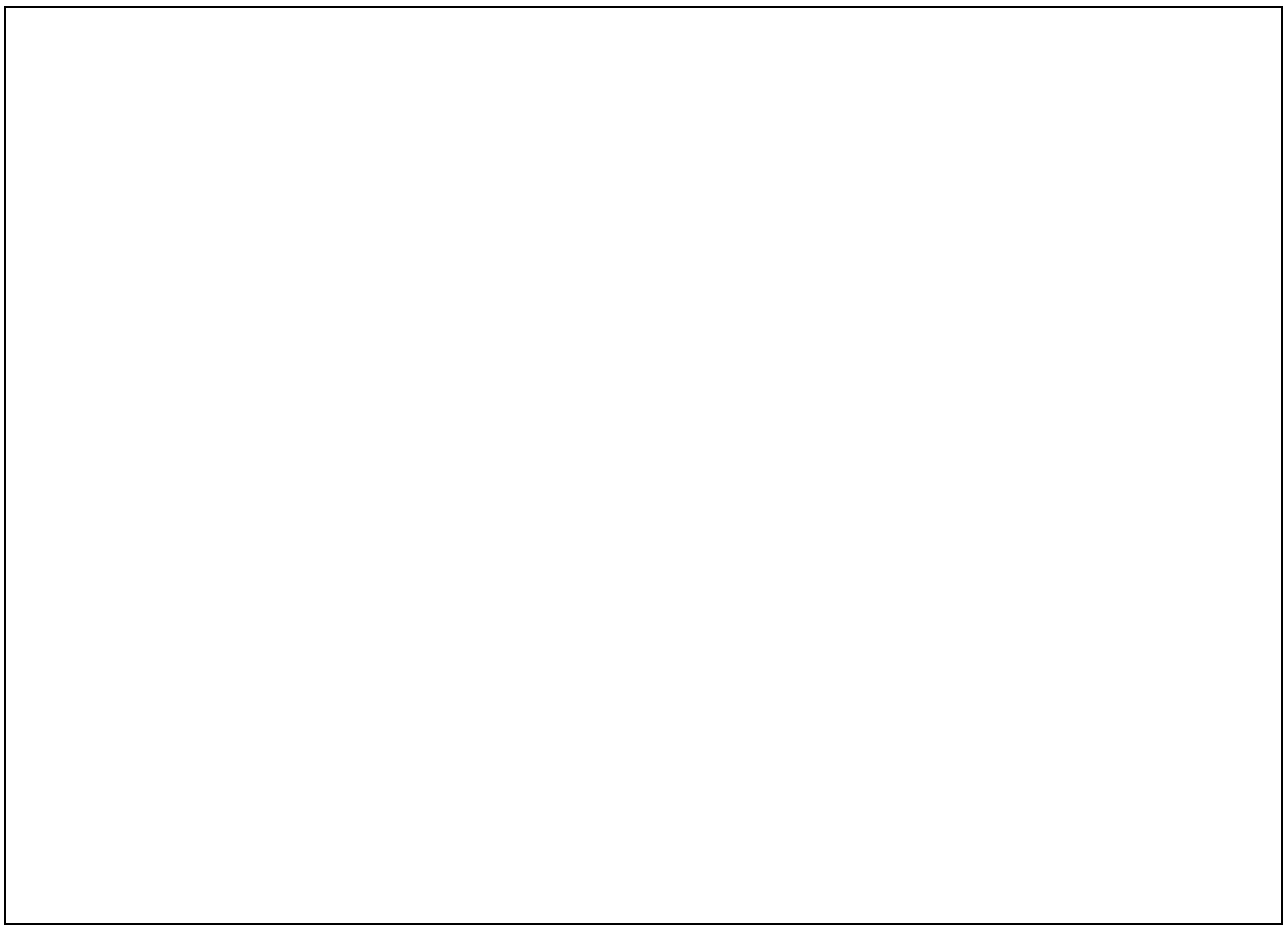
Циљ истраживања је да се, на основу доступне научне литературе, прикажу и анализирају досадашња сазнања о примени мезенхимских матичних ћелија (MSCs) и њихових деривата у терапији неуродегенеративних болести, са посебним фокусом на Алцхајмерову болест (АБ). Циљано, пажња је доминантно усмерена на испитивања предности MSCs и њихових деривата у потенцијалној терапији АБ, Паркинсоновој болести, амиотрофичној латералној склерози, Хантингтоновој болести и мултиплој склерози у односу на постојеће терапије. Анализирани су и механизми деловања, ефекти, безбедност и потенцијал екстрацелуларних везикула/егзозома, секретома и кондиционираног медијума, поредећи са терапијом живим ћелијама и „cell-free“ приступом.

Истраживачке хипотезе:

1. Мезенхимске матичне ћелије (MSCs) и њихови деривати имају потенцијал да успоравају прогресију неуродегенеративних процеса код Алцхајмерове болести.
2. Примена MSC може побољшати когнитивне функције и смањити упалне процесе у централном нервном систему.
3. Деривати MSCs (егзосоми, секретом, кондиционирани медијум) могу пружити сличне или боље терапеутске ефекте у односу на ћелијску терапију, уз мањи ризик од нежелених ефеката.
4. Постојећи експериментални и клинички подаци могу указати на оптималне приступе и ограничења у примени MSCs у терапији Алцхајмерове болести.

Методологија:

Коришћен је наративни, структурисани преглед доступне литературе, уз систематизовану претрагу и квалитативну анализу резултата. Преглед је обухватио базе PubMed/MEDLINE, Scopus, Web of Science и Google Scholar. Коришћене су кључне речи које се односе на MSCs, њихове деривате и неуродегенеративна обољења. Обухваћене су претклиничке и клиничке студије, уз дефинисане критеријуме укључивања и искључивања. Анализирани су ефикасност, безбедност, механизми деловања и потенцијал примене MSCs и њихових деривата.



Остварени резултати истраживања
(највише 1500 каратера)

Прегледом доступне литературе утврђено је да MSCs и њихови деривати представљају потенцијалан терапијски приступ у лечењу неуродегенеративних обољења, са значајним потенцијалом у Алцхајмеровој болести. Преклиничка истраживања показала су могућност истовременог деловања на више патолошких процеса, укључујући неуроинфламацију, оксидативни стрес, синаптичку дисфункцију, поремећаје протеостазе и промене микроокружења ЦНС-а, уз функционална побољшања. Значајан део терапијског ефекта MSCs остварује се паракриним деловањем, због чега MSCs-EVs/MSCs-Exo, MSCs-Sec и MSCs-CM представљају важан правац развоја „cell-free“ терапије.

У Алцхајмеровој болести уочени су ефекти на Аβ оптерећење, неуроинфламацију и синаптичку функцију, док су клиничка истраживања показала углавном прихватљив безбедносни профил, али ограничену и варијабилну ефикасност. Код Паркинсонове болести деривати показују дејство на неуроинфламацију, оксидативни и митохондријални стрес и α-синуклеин патологију, уз потенцијално побољшање моторичких функција. Код ALS забележени су охрабрујући преклинички и рани клинички резултати, док су докази код Хантингтонове болести и мултипле склерозе, посебно за деривате MSCs, још увек ограничени.

Уочена је потреба за стандардизацијом MSCs производа, дефинисањем доза и путева примене и спровођењем већих контролисаних клиничких студија ради поузданије процене њихове ефикасности у клиничкој пракси.

Структира урађеног мастер рада

Сажетак

Abstract

1. УВОД
   1.1. Неуродегенеративне болести
   1.2. Механизми настанка неуродегенеративних болести
   1.2.1. Механизми настанка Алцхајмерове болести
   1.2.2. Механизми настанка Паркинсонове болести
   1.2.3. Механизми настанка амиотрофне латералне склерозе
   1.2.4. Механизми настанка Хантингтонове болести
   1.2.5. Механизми настанка мултипле склерозе
   1.3. Ограничења тренутних терапијских стратегија у лечењу неуродегенеративних болести
2. Терапијски потенцијал MSCs у лечењу неуродегенеративних болести
   2.1. MSCs и њихове биолошке карактеристике
   2.2. Утицај MSCs на механизме настанка неуродегенеративних обољења
   2.3. Предности примене MSCs у лечењу неуродегенеративних обољења
   2.4. Ограничења и изазови примене MSCs у неуродегенеративним обољењима
3. Деривати MSCs – основне карактеристике
   3.1. Секретом MSCs, екстрацелуларне везикуле и егзозоми и кондиционирани медијум
   3.2. Механизми деловања MSCs деривата на патолошке механизме који се налазе у основи неуродегенеративних обољења
   3.3. Предности деривата MSCs у односу на ћелијску терапију MSCs
4. Методологија
   4.1. Методолошки оквир
   4.2. Претраживачка стратегија
   4.3. Критеријуми укључивања и искључивања
   4.4. Систематизација и анализа података
   4.5. Етички аспекти и значај за клиничку примену
   4.6. Ограничења методолошког приступа
5. Претклиничке студије
   5.1. Студије на животињским моделима – MSCs терапија
   5.1.1. Студије на животињским моделима АБ – MSCs терапија
   5.1.2. Студије на животињским моделима осталих неуродегенеративних обољења – MSCs терапија
   5.2. Студије на животињским моделима – терапија MSCs дериватима
   5.2.1. Студије на животињским моделима АБ – терапија MSCs дериватима
   5.2.2. Студије на животињским моделима осталих неуродегенеративних обољења – терапија MSCs дериватима
6. Клиничке студије
   6.1. Клиничке студије примене MSCs код АБ
   6.2. Клиничке студије примене MSCs код осталих неуродегенеративних обољења
   6.3. Клиничке студије примене MSCs деривата код АБ

6.4. Клиничке студије примене деривата MSCs код осталих неуродегенеративних обољења
7. Дискусија
7.1. Критичка анализа резултата
7.2. Поређење налаза прегледа литературе са постојећим истраживањима и транслациони контекст
7.3. Ограничења студија и рада
8. Закључак
8.1. Сажетак најважнијих налаза
8.2. Научни и стручни допринос рада
8.3. Ограничења рада и препоруке за будућа истраживања
9. ЛИТЕРАТУРА

Закључак и предлог комисије
На основу свега наведеног, Комисија за оцену и одбрану мастер рада кандидата Вујовић Александре, под насловом „Примена мезенхималних матичних ћелија и њихових деривата у терапији неуродегенеративних болести са посебним фокусом на Алцхајмерову болест “, сматра да рад испуњава све услове за јавну одбрану и својим потписима по потврђује.

Чланови комисије	
Потпис првог члана комисије (предесник)	
Потпис другог члана комисије (ментор)	
Потпис трећег члана комисије	
Место	
Датум	

Изјава кандидата

Под пуном моралном, материјалном и кривичном одговорношћу изјављујем да су подаци изнети у Образложењу теме мастер рада под насловом „*Примена мезенхималних матичних ћелија и њихових деривата у терапији неуродегенеративних болести са посебним фокусом на Алцхајмерову болест“*

моје ауторско дело, да сам без ограничења носилац ауторских права над њима (у складу са Законом о ауторском и сродним правила „Сл. гласник РС“, бр.104/2009, 99/2011, 119/2012, 29/2016-одлука УС) и да њиховим коришћењем не вређам права трећих лица.

У Крагујевцу, Кандидат

..... _____

Факултет медицинских наука у Крагујевцу

Прегледавши завршни мастер рад кандидата Вујовић Александре под називом „Примена мезенхималних матичних ћелија и њихових деривата у терапији неуродегенеративних болести са посебним фокусом на Алцхајмерову болест“

Сматрам да исти може да уђе у даљу процедуру.

У Крагујевцу, Ментор

_____. године проф.др_____