

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicíně

Studijní obor: Experimentální chirurgie



MUDr. David Stehlík

Mezenchymové stromální multipotentní buňky v ortopedii

Potenciace hojení kosti

Multipotent mesenchymal stromal cells in orthopedic

Potential of bone healing

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Trč CSc., MBA,

Konsultant: MUDr. Robert Pytlík,

Praha 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 22.6.2015

David Stehlík

Podpis

Identifikační záznam:

Stehlík, David. *Mezenchymové stromální multipotentní buňky v ortopedii - Potenciace hojení kostí. [Multipotent mesenchymal stromal cells in orthopedic - Potentiation of bone healing]. Praha, 2015. Počet stran 100. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika dětské a dospělé ortopedie a traumatologie 2. LF UK a FN Motol. Školitel: Trč Tomáš.*

Souhrn

Cíl této práce byl vývoj inovativní léčebné metody kostních defektů. Lidské multipotentní mesenchymální stromální buňky (MSC) hrají ústřední roli v hojení kosti. Klinická použití MSC vyžadují velká množství buněk, která mohou být získána autologní expanzí MSC odebraných z kostní dřeně. Prvním krokem bylo použití standardního protokolu založeného na α -MEM mediu a fetálním telecím séru (FBS). Výsledkem experimentů, kde bylo FBS v kultivačním mediu nahrazováno lidským sérem (HS), bylo patentování nového MSC kultivačního postupu (EU 1999250, ČR 301 141). Jednostupňový kultivační protokol a medium bez xenogenních bílkovin jsou založeny na mediu schváleném ke klinickému použití pro hematopoetické buňky - CellGro®, HS, lidských rekombinantních růstových faktorech, dexametazonu, insulinu a kyselině askorbové. Preklinické experimenty *in vitro* i *in vivo* byly prováděny s MSC expandovanými oběma způsoby. Vláknité polylaktidové nosiče byly osazeny MSC, kultivovány, diferencovány a implantovány imunodeficientní myším (NOD/LtSz-Rag1-). Byla pozorována mineralizovaná tkáň podobná kosti obsahující cévy. MSC kultivované patentovanou metodou byly klasifikovány jako léčivý přípravek pro moderní terapii a musí splnit požadavky Evropské lékové agentury, aby mohly vstoupit do klinických studií. Nicméně užití těchto MSC se zdá nadějně pro buněčnou terapii i skeletální tkáňové inženýrství.

Klíčová slova: buněčná terapie, dobrá výrobní praxe (GMP), hojení kosti, *in vivo*, MSC, nosič, přípravek pro moderní terapii (ATMP).

Abstract

The aim of the thesis was development of an innovative treatment of bone defects. Human multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) play a crucial role in bone healing. Clinical applications of MSC require large amount of cells, which could be obtained by autologous expansion of MSC harvested from bone marrow. As a first step, the standard protocol of MSC expansion based on α MEM medium and fetal bovine serum (FBS) was used. Experiments replacing FBS by pooled human serum (HS) in the culture medium concluded in patenting of a new MSC cultivation protocol (EU 1999250, CR 301141). This one-step cultivation protocol and xenogeneic protein-free cultivation medium is based on CellGro® for Hematopoietic Cells' Medium, HS, human recombinant growth factors, dexamethasone, insulin and ascorbic acid. The preclinical *in vitro* and *in vivo* experiments with MSC from both expansion protocols were carried out. Fibrillar poly(lactic acid) scaffolds were seeded with MSC, cultured, differentiated and implanted in immunodeficient mice (NOD/LtSz-Rag1^{-/-}). Bone-like mineralized tissue containing vessels was observed. The MSC cultured according to patented method were classified as Advanced-therapy Medicinal Product and has to fulfil the European Medicines Agency regulations to enter the clinical trials. Nevertheless the use of MSC seems to be promising in cell therapy as well as in skeletal tissue engineering.

Key words: Advanced-therapy Medicinal Products (ATMP), bone healing, cell therapy, GMP, *in vivo*, MSC, scaffold,

Obsah:

1 ÚVOD	9
1.1 HOJENÍ KOSTI.....	9
1.1.1 <i>Osteoinduktivní faktory</i>	9
1.1.2 <i>Osteokonduktivní faktory</i>	10
1.1.3 <i>Buněčná složka</i>	10
1.2 FYZIOLOGIE HOJENÍ KOSTI.....	10
1.3 MEZENCHYMOVÉ STROMÁLNÍ MULTIPOTENTNÍ BUŇKY.....	13
1.3.1 <i>Povrchové znaky MSC</i>	14
1.3.2 <i>Diferenciace MSC v osteoblastovou linii</i>	16
1.4 ZÁKLADNÍ RŮSTOVÉ FAKTORY A SUPLEMENTY KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ VE VZTAHU KE KOSTNÍ TKÁNI	17
1.4.1 <i>EGF</i>	17
1.4.2 <i>HGF</i>	17
1.4.3 <i>VEGF</i>	18
1.4.4 <i>PDGF</i>	18
1.4.5 <i>M-CSF</i>	19
1.4.6 <i>FGF-2</i>	19
1.4.7 <i>IGF-I a IGF-II</i>	20
1.4.8 <i>TGF – β</i>	20
1.4.9 <i>Kostní morfogenetické proteiny (BMPs)</i>	21
1.4.10 <i>Kortikosteroidy</i>	23
1.4.11 <i>Kyselina askorbová</i>	23
1.5 BUNĚČNÁ TERAPIE.....	23
1.6 STIMULACE HOJENÍ KOSTI POMOCÍ MSC.....	24
1.6.1 <i>Autologní kostní štěpy</i>	25
1.6.2 <i>Kostní dřev</i>	25
1.6.3 <i>Koncentrovaná kostní dřev</i>	26
1.6.4 <i>Kultivované MSC</i>	27
1.6.5 <i>Separované cirkulující MSC</i>	29
1.7 NOSIČE	29
1.8 MODEL NOD/LTSZ-RAG1 ⁻ PRO IN VIVO EXPERIMENT.....	31
1.9 LEGISLATIVA.....	31
2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	33
3 METODIKA	34

3.1	ODBĚR MSC	34
3.2	ZPRACOVÁNÍ KOSTNÍ KRVE.....	34
3.3	MEDIA A SUPLEMENTY.....	35
3.4	STANDARDNÍ PRIMÁRNÍ KULTIVACE MSC.....	35
3.5	KOKULTIVACE MSC S ALOGENNÍMI MONOCYTY PERIFERNÍ KRVE.....	36
3.6	MSC KULTIVACE KE KLINICKÉMU POUŽITÍ	37
3.7	STANOVENÍ POČTU MSC PO PRIMÁRNÍ EXPANZI.....	38
3.8	ANTIGENNÍ ANALÝZA BUNĚK PRIMÁRNÍ EXPANZE	39
3.9	STANOVENÍ BMP 2, BMP 7 A OSTEOKALCINU	40
3.10	PRŮKAZ DIFERENCIAČNÍ SCHOPNOSTI PRIMOKULTIVACÍ MSC	40
3.10.1	<i>Osteogenní diferenciacie.....</i>	41
3.10.2	<i>Adipogenní diferenciacie.....</i>	42
3.10.3	<i>Chondrogenní diferenciacie.....</i>	43
3.11	PLLA/PDLLA NOSIČE	43
3.11.1	<i>Ploché PLLA/PDLLA nosiče.....</i>	43
3.11.1.1	<i>Adherence.....</i>	44
3.11.1.2	<i>Diferenciacie MSC na 2D površích</i>	45
3.11.1.3	<i>Adipogenní diferenciacie.....</i>	45
3.11.1.4	<i>Osteogenní diferenciacie</i>	45
3.11.2	3D PLLA/PDLLA NOSIČE.....	46
3.11.2.1	<i>Kultivace a osteogenní diferenciacie MSC na trojrozměrném PLLA/PDLLA nosiči</i>	47
3.11.2.2	<i>Barvení von Kossa.....</i>	48
3.11.2.3	<i>Barvení na alkalickou fosfatázu</i>	48
3.11.2.4	<i>Elektronová mikroskopie a prvková analýza</i>	49
3.11.2.5	<i>Imunohistochemická barvení.....</i>	49
3.12	IN-VIVO IMPLANTACE NOSIČŮ.....	49
3.13	<i>Statistická analýza.....</i>	50
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	51
4.1	ODBĚR MSC	51
4.2	ZPRACOVÁNÍ KOSTNÍ KRVE.....	51
4.3	MEDIA A SUPLEMENTY.....	52
4.4	STANDARDNÍ PRIMÁRNÍ KULTIVACE MSC.....	52
4.5	KOKULTIVACE MSC S ALOGENNÍMI MONOCYTY PERIFERNÍ KRVE	52
4.6	MSC KULTIVACE KE KLINICKÉMU POUŽITÍ	54
4.7	STANOVENÍ POČTU MSC PO PRIMÁRNÍ EXPANZI.....	56

4.8	ANTIGENNÍ ANALÝZA BUNĚK PRIMÁRNÍ EXPANZE	56
4.9	STANOVENÍ BMP 2, BMP 7 A OSTEOKALCINU	57
4.10	PRŮKAZ DIFERENCIAČNÍ SCHOPNOSTI PRIMOKULTIVACÍ MSC	59
4.10.1	<i>Osteogenní diferenciací MSC</i>	59
4.10.2	<i>Adipogenní diferenciací</i>	61
4.10.3	<i>Chondrogenní diferenciací</i>	61
4.11	PLLA/PDLLA.....	63
4.11.1	ADHERENCE, KULTIVACE A DIFERENCIACE NA 2D PLLA/PDLLA NOSIČÍCH.....	63
4.11.2	3D PLLA/PDLLA NOSIČE.....	65
4.11.2.1	KULTIVACE A DIFERENCIACE NA 3D PLLA/PDLLA.....	65
4.11.2.2	IN VIVO IMPLANTACE 3D PLLA/PDLLA NOSIČE NA NOD/LTSZ-RAG1- MODELU68	
5	ZÁVĚR	71
6	PODĚKOVÁNÍ	72
7	SEZNAM ZKRATEK	73
8	LITERATURA	76

1 Úvod

Zlomeniny svou incidencí přesahují 3000 případů na 100.000 obyvatel (Donaldson et al. 2008). Fraktury svojí morbiditou, mortalitou, náklady na léčení a následnou péči představují závažný socioekonomický problém.

1.1 Hojení kosti

Hojení kostí je velmi komplexní děj, pro jehož úspěšný průběh jsou nutné tři složky: osteoinduktivní faktory, osteokonduktivní matrix a buňky kosti (Giannoudis et al. 2007, Calori a Giannoudis 2011). Dojde-li k deficitu jedné či více těchto složek, je hojení kosti ohroženo. Jediný materiál, který je v současné době možno použít k náhradě kosti či pro přemostění nehojících se kostních defektů a který zároveň obsahuje všechny výše zmíněné složky, je autologní kostní štěp. Autologní kostní štěp je získáván většinou z lopaty kosti kyčelní. Množství takto získaného štěpu je omezené, jeho použití prodlužuje dobu operace a může působit pooperační komplikace v místě odběru. Proto je v současné době věnována intenzivní pozornost léčebným postupům, které budou schopny autologní štěp nahradit.

1.1.1 Osteoinduktivní faktory

Osteoinduktivní faktory indukují různé fáze regenerace kosti. Morfogenní proteiny, nejdůležitější z osteoinduktivních faktorů (bone morphogenetic proteins – BMPs) detekovány v demineralizované kostní matrix patří k rozsáhlé skupině proteinů ovlivňujícím diferenciaci buněk. Pro kostní tkáň jsou nejdůležitější BMP 2, BMP 4 a BMP 7 (OP 1). Dalšími faktory jsou např. TGF β , PDGF, FGF-2, IGF-I, IGF-II, IL-1, IL-2 či parathormon v součinnosti s jejich receptory, vazebnými molekulami, aktivátory a inhibitory.

1.1.2 Osteokonduktivní faktory

Osteokonduktivní matrix v kosti, z většiny tvořená kolagenem I, ale i dalšími proteiny, poskytuje fyzickou podporu (molekulární lešení) prekurzorovým buňkám při novotvorbě kosti, funguje jako výztuž kalcifikované kosti a navíc je biodegradabilní. Proto nedílnou součástí ideálního umělého kostního štěpu by měl být i vhodný nosič. Jako vstřebatelné nosiče jsou používány například kolagen I, hydroxyapatit a trikalciumfosfát (TCP), polylaktid-glykolid (PLGA) a další.

1.1.3 Buněčná složka

Buňky, které jsou schopné masivní produkce vlastní kostní matrix jsou nazývány osteoblasty. Osteoblasty vznikají z osteoblastových prekurzorů, přítomných v okolní tkáni, nebo diferenciací mezenchymových multipotentních stromálních kmenových buněk (MSC), které jsou předchůdci osteoblastových prekurzorů. MSC se vyskytují v kostní dřeni s četností 1 na 10^3 - 10^4 mononukleárních buněk (Werntz et al. 1996). Tyto buňky jsou schopny diferenciaci v kost, chrupavku ale i další tkáň a to jak při obnově a traumatu *in vivo*, tak *in vitro* při přenesení do vhodného prostředí či po dodání vhodných stimulačních faktorů.

1.2 Fyziologie hojení kostí

Zásadní roli v hojení kostí hrají kmenové buňky. Hlavními zdroji kmenových buněk pro hojení kosti je periost, endost a svalová tkáň. Kostní tkáň je schopná se zhojit bez vazivové jizvy a je schopna zrestaurovat svoje biomechanické vlastnosti *ad integrum* (Marsell a Einhorn 2011). Hojení zlomenin, stejně jako vývoj kosti může nastat dvěma způsoby: endesmální či enchondrální osifikací, nebo kombinací obou. V prvním případě jde o primární hojení, kdy se svalek nevytváří, dochází k přestavbě a propojení Haverských systémů endesmální osifikací. Můžeme identifikovat dva rozdílné způsoby primárního hojení a to kontaktní a štěrbinové hojení. Typ primárního hojení se liší množstvím vytvořené kostní matrix v linii lomu, která je ovlivněna zejména vzdáleností obou fragmentů. Kontaktní hojení nastává při vzdálenosti fragmentů do 100 μm , štěrbinové hojení při vzdálenosti 800-1000 μm . Pro primární hojení je nutná anatomická repozice a stabilita

fragmentů. Osteoklasty, které resorbují poškozené osteony v oblasti linie lomu, jsou následovány endoteliálními buňkami a MSC, které diferencují v osteoblasty produkující osteoid, který poté mineralizuje (Einhorn 1998). Nově vznikající osteony postupně překlenují linii lomu a tak se mechanická odolnost navrácí později než u sekundárního hojení (Marsell a Einhorn 2011). Pouze primární hojení při zlomeninách nastává výjimečně (Phillips 2005).

Sekundární, nebo také nepřímé hojení kosti probíhá enchondrální osifikací. Při tomto procesu tedy dochází k diferenciaci kmenových buněk na chondroblasty a chondrocyty, kalcifikaci extracelulární matrix a následně k jejímu nahrazení vláknitou a následně lamelární kostní tkání (Schindeler et al. 2008). Sekundární hojení kosti probíhá ve 3 základních fázích: zánětlivá fáze, fáze proliferativní a fáze remodelace (Oryan et al. 2015). Zánětlivá fáze následuje ihned po traumatu a trvá přibližně týden. Tato fáze začíná formováním hematomu vznikajícího zejména z cév poškozené kostní tkáně, periostu a samotné kostní dřevě. Koagulační kaskáda způsobí nejen vznik fibrinové sítě, ale hlavně degranulaci trombocytů. Z trombocytů a plazmy jsou tak uvolněny růstové faktory jako epidermální růstový faktor (EGF), fibroblastový růstový faktor 2, 4, 17 a 18 (FGF-2, FGF-4, FGF-17 a FGF-18), destičkové růstové faktory (PDGFs), transformující růstový faktor (TGF- β 1) a inzulínu podobný růstový faktor I a II (IGF-I, IGF-II), hepatocytový růstový faktor (HGF) a další (Kruger et al. 2013). Fibrinová vlákna slouží jako prozatímní molekulární lešení, které je využito buňkami k migraci. Monocyty, makrofágy neutrofilů a další buňky v hematomu jsou také zdrojem zánětlivých cytokínů, jako jsou interleukin-1, 6, 11 a 18 (IL-1, IL-6, IL-11, IL-18) a faktor nekrotizující nádory- α (tumor necrosis factor- α (TNF- α)) (Mountziaris a Mikos 2008), jejichž hladina zůstává zvýšená po několik dní. TNF- α stimuluje k sekreci dalších zánětlivých cytokínů a zdá se že hraje zásadní roli ve stimulaci migrace MSC a dalších progenitorů z okolních tkání (Glass et al. 2011, Marsell a Einhorn 2011). Cytokíny atrahují další buňky zánětu. Samotná hypoxie nepůsobí jen nekrózu a degeneraci osteoblastů, ale je také sama spouštěcím mechanismem pro sekreci různých růstových faktorů a prostaglandinů. Diskutována je také úloha hypoxií indukovaného factoru-1a (HIF-1a), který se zdá být jedním z iniciálních faktorů ovlivňující expresi VEGF a proliferaci samotných MSC (Haque et al. 2013). Růstové faktory produkované buňkami v místě hematomu a to zejména PDGF, FGF-2, BMP-2, BMP-5, BMP-7, TGF β stimulují migraci, proliferaci a diferenciaci

MSC směrem k osteoblastové, chondroblastové, fibroblastové a endotelové linii. Endotelové buňky, osteoblasty, fibroblasty, chondroblasty a další buňky se účastní formace granulární tkáně ve fibrinové síti hematomu a vyplňují oblast zlomeniny (Marsell a Einhorn 2011). Vzniká primitivní kalus, který stabilizuje zlomeninu. Proliferativní fáze začíná formováním měkkého svalku, kdy fibrinový konstrukt je nahrazován kolagenovým. Nekrotické konce kostí jsou resorbovány osteoklasty derivovanými z periferních monocytů, či mononukleární složky kostní dřeně. Z extracelulární matrix jsou uvolňovány a aktivovány růstové faktory a to zejména BMP2, BMP4 a IGF-I. Vrstání cév je stimulováno produkcí VEGF a je následováno osteogenní diferenciací MSC, ke které přispívá produkce BMP-2 endotelovými buňkami (Keramaris et al. 2008). Zejména v hypoxické části svalku dochází k chondrogenní diferenciaci MSC (Geris et al. 2008). Diferenciace je ovlivněna i mechanickými podněty. V mechanicky stabilních oblastech dochází k osteoblastové diferenciaci, v méně stabilních částech spíše k diferenciaci chondrogenní. Měkký svalek přemostí a stabilizuje zlomeninu. V oblasti vzdálenější od linie lomu a tedy i mechanicky stabilnější je produkován osteoid multidirekcionálně tzv. mezenchymovými osteoblasty (Shapiro 2008) a začíná produkce vláknité kosti. V oblastech enchondrální osifikace dochází ke kalcifikaci extracelulární matrix. Postupem enchondrální osifikace a růstem vláknité kosti na chrupavčitém podkladě se mění měkký svalek na tvrdý.

Fáze remodelace se v jejím začátku překrývá s reparační fází a pokračuje dlouho po klinickém zhojení zlomeniny. Remodelační fáze zahrnuje mineralizaci svalku a jeho náhradu mineralizovanou kostí a její postupnou přestavbu. Dochází k polarizaci osteoblastů, které začínají vytvářet lineární lamelární strukturu (Shapiro 2008). Nastává tedy postupné odbourávání vláknité kosti a nahrazení lamelárními strukturami již podobnými Haverským systémům zralé kosti. Podobně jako na růstové ploténce, při růstu kosti, dochází v oblastech enchondrální osifikace k hypertrofii chondrocytů a kalcifikaci jejich extracelulární matrix. Následně chondrocyty prodělávají apoptózu. Extracelulární hmota je odstraňována chondroclasty, které doprovází invazi cév zejména z periferie hojící se kosti. Cévy jsou doprovázeny osteoblastovými prekurzory, ne již zralými osteoblasty (Maes et al. 2010). Kolagen II a X je v těchto oblastech nahrazován kolagenem I. Kolagen I je produkován osteoblasty, jako komponenta osteoidu. Na chrupavčitých

základech v oblastech enchondrální osifikace je stavěna vláknitá kost, která zvýší pevnost spojení fragmentů. Postupně je primitivní vláknitá kost nahrazována lamelárními strukturami, které jsou produkovány již polarizovanými povrchovými osteoblasty. Struktura tak není již izotropická, ale nově tvořené osteony jsou svou osou orientovány paralelně k dlouhé osy kosti. Architektonika trabekul začíná postupně odpovídat normálním trajektoriím přenosu sil hojené kosti. V tomto procesu hraje důležitou úlohu mechanická stimulace zátěží a tahem svalových skupin. Remodelace nově vytvořené kosti podléhá stejným zákonitostem, tedy i Wolffovu zákonu, stejně jako fyziologická remodelace skeletu. Pokročilé fáze remodelace jsou ovlivňovány zejména IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α , IL-12, interferonem γ (IFN- γ) a parathormonem (PTH) (Mountziaris a Mikos 2008). Pokud probíhá hojení ve vyhovujícím postavení dochází postupně k plnému návratu mechanických vlastností kosti. Kost začne plnit i další svoje fyziologické funkce v minerálovém metabolismu a v predilekčních oblastech i funkci hematopoetickou, tedy kontinuita dřevného kanálu je zpravidla obnovena a rekonstruována je i kostní dřev.

1.3 Mezenchymové stromální multipotentní buňky

Buňky s velkou proliferační aktivitou nacházející se ve stromatu kostní dřevě byly pozorovány Friedensteinem v roce 1966 a detailněji popsány v roce 1968, kdy byly analyzovány prekurzorové buňky kostní dřevě (Friedenstein et al. 1966, Friedenstein et al. 1968). Následně Friedenstein a další autoři poukázali na schopnost buněk jedné kolonie (colony forming units- fibroblastic (CFU-F)) diferencovat se do osteogenní, adipogenní a chondrogenní buněčné linie (Owen a Friedenstein 1988). Dalším studiem těchto populací, byly buňky schopné diferencovat do různých linií identifikovány a nazvány mezenchymové kmenové buňky (mesenchymal stem cells (MSC)) (Horwitz et al. 2005). MSC jsou různorodou populací progenitorových buněk s různou diferenciací kapacitou (Muraglia et al. 2000, Jiang et al. 2002, Meyer et al. 2004). MSC byly poprvé izolovány z kostní dřevě, ale buňky s podobnou charakteristikou se nacházejí v hojném počtu i v dalších tkáních. Buňky s MSC znaky jsou přítomny ve svalech (Jiang et al. 2002), zubní pulpě (Shi a Gronthos 2003), tukové tkáni (Tholpady et

al. 2003), placentě (Fukuchi et al. 2004), pupečnickové krvi (Romanov et al. 2003), amniové tekutině (In 't Anker et al. 2003), plicích (Jarvinen et al. 2008), kůži (Toma et al. 2005) a dalších tkáních.

Mezinárodní společností pro buněčnou terapii byla stanovena minimální kritéria pro MSC (Dominici et al. 2006). Aby buňka mohla být nazývána MSC, musí adherovat k plastu při standardních kultivačních podmínkách, musí exprimovat CD105, CD73 a CD90 a zároveň nesmí exprimovat CD45, CD34, CD14 nebo CD11b, CD79alfa nebo CD19, HLA-DR a současně musí diferencovat do osteoblastové, adipocytové a chondroblastové linie. MSC jsou pravděpodobně schopné diferenciaci do endotelií a kardiomyocytů (Prockop 1997, Makino et al. 1999), neurálních buněk (Chopp a Li 2002, Zhao et al. 2002) a beta buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu (Chen et al. 2004). S jistotou lze říci, že MSC jsou schopné diferenciaci do adipocytů, chondrocytů (Mackay et al. 1998) a v neposlední řadě osteoblastů (Pittenger et al. 1999). Nutno zdůraznit, že MSC nacházející se v kostní dřeni a periostu hrají ústřední roli ve fyziologické regeneraci kosti (Chaudhary et al. 2004, Meyer et al. 2004, Muschler et al. 2004). Regenerace kostní tkáně je jednou z hlavních funkcí MSC. Kostní dřevina je nejčastěji používaným zdrojem MSC. Populace MSC pozitivních na nestin je významnou součástí niky kostní dřeviny spolu s hematopoetickými kmenovými buňkami (HSC) a jejich více diferencovanými formami jako makrofágy, megakaryocyty, lymfocyty, endotelovými buňkami, pericyty, osteoblasty, vlákna sympatiku a dalšími (Mendez-Ferrer et al. 2010, Mendelson a Frenette 2014). Dalším častým zdrojem buněk s MSC znaky je tuková tkáň, jmenovitě okolí cév v tukové tkáni, a to s velmi dobrým výtěžkem. Diferenční a další schopnosti těchto buněk jsou nadále studovány a jejich použití v klinické regenerační medicíně skeletu musí být ještě prokázána (Vishnubalaji et al. 2012). Fyziologická funkce těchto buněk se však jeví spíše v regulaci zánětu, imunomodulaci a hojení ran (Bianco 2015).

1.3.1 Povrchové znaky MSC

Univerzální povrchový znak, který by identifikoval MSC prozatím neexistuje, proto byly stanoveny celulórní antigeny, které jsou s MSC spojeny. Mezi základní

markery MSC patří CD105, CD73, CD90 a CD44, některé subpopulace exprimují také STRO-1, CD 106(VCAM-1) a CD146.

Endoglin (CD105) je glykoprotein, který je jako koreceptor součástí transforming growth factor β (TGF- β) receptoru I a II (Guerrero-Esteo et al. 2002). Jako CD73 je označován enzym vázaný na vnější stranu cytoplazmatické membrány– NT5E (membrane-bound ecto-5'nucleotidase) štěpící purinové mononukleotidy na nukleosidy.

CD90 je konservovaný N-glykosylovaný povrchový buněčný protein kotvený glykofosfatidylinositolem. CD44 povrchový glykoprotein je receptorem kyseliny hyaluronové, ale váže se i na osteopontin, fibronektin, kolagen a další složky extracelulární matrix. STRO-1 je antigen, který měl být markerem MSC (Simmons a Torok-Storb 1991, Gronthos et al. 1994), dle dalších autorů jde spíše o antigen endoteliální, který se na MSC vyskytuje indukovaně (Burfening et al. 1969, Lin et al. 2011, Ning et al. 2011), stejně jako na osteoprogenitorech (Yu et al. 2010). CD 106 (vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)) je adhezivní molekula vyskytující se na subpopulaci MSC (Gronthos et al. 2003, Yang et al. 2013).

CD146 zvaný také melanoma cell adhesion molecule (MCAM) funguje jako receptor pro laminin alfa 4, vyskytující se hojně v téměř celé stěně cév. Přítomnost DC146 byla prokázána na subpopulaci MSC (Sacchetti et al. 2007). MSC dle zatím platné definice neexprimují CD45, CD34, CD14 nebo CD11b, CD79alfa nebo CD19, HLA-DR, ale pravděpodobně také nenesou na svém povrchu ani další jako antigeny jako CD31.

CD 45 (společný leukocytový antigen (LCA), protein tyrosine phosphatase receptor type (PTPRC)) se vyskytuje v různých izoformách. CD45 je exprimován na hematopoetických buňkách, ale není přítomen na MSC.

CD34 je silně glykosylovaný typ I transmembránový protein, který je exprimovaný hematopoetickými kmenovými buňkami a hematopoetickými progenitory. CD 34 je nejkontroverznějším znakem, jeho přítomnost či nepřítomnost na povrchu MSC zůstává otázkou. Dle minimálních kritérií pro MSC (Dominici et al. 2006), tyto buňky CD 34 neexprimují, ale zdá se, že některé subfrakce MSC a to zejména MSC získané z tukové tkáně CD34 exprimují (Delorme a Charbord 2007, Lin et al. 2012). Některými autory je považován CD34 za obecný marker kmenových buněk (Sidney et al. 2014)

CD11b (integrin α_M) je podjednotkou komplementového receptoru 3 (CR3, Mac-1)) přítomného na leukocytové řadě.

CD14 je koreceptor exprimovaný monocyty, makrofágy (Griffin et al. 1981) a dalšími hematopoetickými buňkami. CD14 váže lipopolysacharid (LPS), hraje tedy roli v přirozené imunitě. CD79 α je transmembránový protein tvořící s CD79 β komplex receptoru B lymfocytů (BCR), který se tedy na MSC nevyskytuje. MSC dále neexprimují CD31 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)), který je přítomný na endotelových buňkách, trombocytech, makrofázích, NK buňkách, neutrofilech a dalších buňkách bílé řady. CD19 je exprimován na B lymfocytech společně s B lymfocytovým receptorem. HLA-DR jako jeden z antigenů HLA II třídy, je přítomen zejména na antigen prezentujících buňkách jako jsou dendritické buňky, makrofágy a B lymfocyty. Antigeny jsou používány k průkazu MSC, ale i k obohacování pozitivní či negativní selekcí, nebo k stanovování kvality buněčného produktu MSC.

1.3.2 Diferenciace MSC v osteoblastovou linii

Z laboratorního pozorování vyplývá, že MSC během diferenciace z kmenové buňky na osteocyty procházejí 3 základními fázemi: nejprve proliferací, poté maturací a produkcí extracelulární matrix a nakonec stádiem její mineralizace (Aubin 2001). Liu dokumentuje minimum sedmi přechodných stádií (Liu et al. 2003) od kmenové buňky po plně diferencovaný osteocyt. MSC ztrácí multipotentnost a diferencuje se na nezralý osteoprogenitor, který dočasně exprimuje kostní sialoprotein (BSP) a osteopontin (OPN), ke své následující diferenciaci ale potřebuje další stimulaci. Zralý osteoprogenitor má pravděpodobně ještě zachovanou schopnost asymetrického dělení a extenzivní proliferace, ale *in vitro* není další diferenciační stimulace nutná. Na základě *in vitro* pozorování prodělají buňky od primitivního osteoprogenitoru k morfologicky zjevnému osteoblastu 9-10 dělení (Malaval et al. 1999). Preosteoblast má již proliferaci limitovanou, exprimuje BSP, OPN, kolagen I a neexprimuje osteokalcin (OCN). Od primitivní buňky až po postmitotické osteoblasty postupně stoupá exprese kostní alkalické fosfatázy (ALP). Pro osteoblasty je typická exprese OCN, Cbfa1 a Osterix ale i produkce kolagenu I a dalších organických složek extracelulární matrix (Bonewald 2011). V osteocytech prudce klesá exprese ALP a OCN.

Osteocyty v nemineralizovaném osteoidu exprimují Phosphate Regulating Endopeptidase Homolog, X-Linked (PHEX), což je membránová metaloproteináza a Dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (DMP-1), který je zásadní pro mineralizaci extracelulární matrix. Pro osteocyty v již mineralizované extracelulární matrix je typická exprese sklerostinu (Poole et al. 2005), jakožto markeru osteocytů a zároveň negativního regulátoru kostní formace. Dále je pro osteocyty zavzaté v mineralizované matrix typická exprese fosfoglykoproteinu extracelulární matrix - matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) a FGF-28, které spolu s PHEX hrají zásadní roli ve fosfátové homeostáze a mineralizaci (Liu et al. 2003, Quarles 2003).

1.4 Základní růstové faktory a suplementy kultivačních médií ve vztahu ke kostní tkáni

1.4.1 EGF

Epidermální růstový faktor (EGF) je prvním objeveným členem v současné době třináctičlenné EGF rodiny s podobnou strukturou a funkcí (transforming growth factor alpha (TGF- α), amfiregulin (AR), betacelulin (BTC), heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), epiregulin (EPR), epigen (EPG) a neureguliny 1–6 (NRG1-6)). EGF je významným mitogenem. EGF se s velkou afinitou váže receptor EGFR, ale i další receptory ErbB rodiny (Seshacharyulu et al. 2012). Hlavním účinkem je proliferace, diferenciace a přežívání (Marqueze-Pouey et al. 2014). EGF stimuluje parakrinní sekreci MSC a hraje tak významnou roli v regeneraci tkání (Kerpedjieva et al. 2012).

1.4.2 HGF

Hepatocytový růstový faktor HGF je faktor ovlivňující proliferaci, migraci a diferenciaci. Váže se na c-Met receptor, který je protoonkogenem, který spouští buněčný program zvaný invazivní růst (Gentile et al. 2008). Při hojení zlomenin či kostní přestavbě jsou MSC zdrojem HGF pro okolní buněčné populace. Odlišné koncentrace HGF produkovaného MSC ovlivňují rozdílně také proliferaci a

diferenciaci samotných MSC (Wen et al. 2012, van de Kamp et al. 2013). HGF je jedním z faktorů odpovědných za uchování MSC v nediferencovaném stavu (Bae et al. 2015). Receptor c-Met je exprimován MSC, ale také je významně zastoupen na buňkách endotelové řady a tím se účastní HGF na angiogenezi v reparující se tkáni (Wen et al. 2014).

1.4.3 VEGF

Termínem vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) je zpravidla označována forma VEGF-A. Obecně však skupina VEGF zahrnuje ještě další členy: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a placentární růstový faktor (PGF). Hypoxií indukované faktory HIFs jsou hlavním regulátorem VEGF produkce (Haque et al. 2013). Hlavním producentem VEGF v kostní tkáni při hypoxii jsou osteoblasty (Wang et al. 2007). Účinek VEGF je zprostředkován receptory VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 a jejich koreceptory. VEGFR1 hraje významnou roli při chemotaxi monocytů a makrofágů. VEGFR1 je negativním regulátorem angiogeneze za vývoje, ale hraje významnou roli v angiogenezi při hojení kosti. EGF a ještě potentněji PGF vazbou na VEGFR1 stimuluje MSC (Maes et al. 2006). VEGFR2 je zásadní pro vývoj a organizaci endotelových buněk a jejich prekurzorů (Takahashi a Shibuya 2005, Li et al. 2006). Endotelie stimulované VEGF přes VEGFR2 produkují BMP-2 a BMP-4. Takto endotelové buňky stimulují k proliferaci a diferenciaci MSC na osteoblastovou linii. Dle nedávných experimentů na myším modelu se tento mechanismus nejeví být zásadní při vývoji skeletu. Avšak jak podstatnou roli hraje tato buněčná komunikace při hojení kostí musí být ještě objasněno dalšími experimenty (McBride et al. 2014).

1.4.4 PDGF

Destičkový růstový faktor PDGF skládající se ze dvou polypeptidů produkovaných 4 různými geny (Fredriksson et al. 2004), tvoří homodimery či heterodimery AA, BB, AB, CC a DD (Reigstad et al. 2005). PDGFs se váží různou afinitou na receptory PDGFR α a β , přičemž receptory dimerizují. PDGF BB je schopen aktivovat receptory ve formách $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ i $\alpha\beta$. PDGFs jsou potentními mitogeny MSC a progenitorových populací a zároveň inhibují diferenciaci těchto buněk, tedy hraje úlohu v udržení těchto buněk v proliferaci a nediferencovaném stavu. PDGFs

u více diferencovaných osteoprogenitorů má diferenciační efekt. Lokální produkce PDGFs stimulována TGF- β a PDGFs. PDGFs a TGF- β trombocytů hraje při traumatu ústřední roli ve spuštění lokální produkce PDGFs osteoblasty. PDGFs snižují produkci BMPs, IGF I i II a kolagenu I. PDGF a zejména jeho BB forma se váže na osteonektin, ale i na další proteiny extracelulární matrix. Takto vázaná forma se podílí jak na reparaci tkáně, tak při remodelaci kosti. Rekombinantní PDGF BB je nyní registrován pro potenciaci hojení kosti v USA (Friedlaender et al. 2013).

1.4.5 M-CSF

Makrofágový kolonie stimulující faktor (M-CSF) také nazývaný kolonie stimulující faktor 1 (CSF-1). M-CSF existuje jako na membránu vázaný, nebo volný disulfidickými vazbami vázaný homodimer. V kostní tkáni je M-CSF exprimován osteoblasty a MSC ale hlavním zdrojem volného M-CSF jsou endotelové buňky. M-CSF se váže na receptor CSFR-1, který pravděpodobně zprostředkovává všechny biologické účinky M-CSF. M-CSF má proliferační a diferenciační účinek na hematopoetické prekurzory a ovlivňuje přežívání monocytů, makrofágů (Lari et al. 2007). Společně s RANKL a GM-CSF je M-CSF esenciální pro vývoj a funkci osteoklastů (Zhao a Ivashkiv 2011).

1.4.6 FGF-2

Fibroblastový růstový faktor 2 (FGF-2) patří do rodiny fibroblastových růstových faktorů které hrají zásadní roli ve vývoji skeletu. Efekt fibroblastových růstových faktorů je zprostředkován 4 receptory FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 a FGFR-4 (Turner a Grose 2010). FGF-2 je exprimován MSC a osteoblasty při endesmální osifikaci. FGF-2 stimuluje stejně jako PDGF produkci gremlin-1 a tím antagonizuje efekt BMP-2 a pravděpodobně udržuje embryonální i mezenchymové kmenové buňky v nediferencovaném stavu (Pereira et al. 2000, Canalis et al. 2012). FGF-2 je secernován nekonvenční cestou (Bae et al. 2015). FGF-2 stimulace má rozdílný efekt v závislosti na stupni diferenciace buněk. Endogenní exprese FGF-2 osteoblasty je stimulována parathormonem i TGF- β . *In vivo* FGF-2 stimuluje expresi TGF- β a VEGF ve více diferencovaných osteoblastech (Takai et al. 2007).

FGF-2 hraje významnou roli spolu s FGF-1 v hojení kosti a je potentnějším angiogenním faktorem než VEGF a PDGF (Yun et al. 2010).

1.4.7 IGF-I a IGF-II

Inzulínu podobný růstový faktor (Insulin-like growth factor - IGF) byl identifikován jako solubilní růstový faktor zprostředkovávající účinek somatotropního růstového hormonu (Daughaday 1971). Rozeznáváme IGF-I a IGF-II. Oba mají strukturu podobnou inzulínu a účinek je zprostředkován receptory IGFR-I a IGFR-II. V séru i v kostní extracelulární matrix je většina IGFs vázána na proteiny vážící IGF (IGFBP1-6). IGFBP váží IGF s větší afinitou než samotné receptory. IGFBP fungují jako regulační proteiny (Kawai a Rosen 2012), stejně jako ALS (acid labile subunit). Lokálním zdrojem IGF-I jsou osteoblasty a odbourávaná extracelulární matrix. IGF-I má především mitogenní aktivitu, ale i diferenciační a chemotaktický potenciál zejména v kostní tkáni (Nakasaki et al. 2008). IGF hrají významnou roli v migraci MSC při vývoji skeletu, remodelaci kosti a hojení zlomenin. Nízká hladina IGF-I v séru pozitivně koreluje s četností výskytu zlomenin kyčelního kloubu (Garnero et al. 2000).

1.4.8 TGF – β

Existují tři izoformy transformujícího růstového faktoru β (transforming growth factor β (TGF- β)): nazvané TGF- β 1, TGF- β 2 TGF- β 3. TGF- β patří do superrodiny TGF- β , která v sobě zahrnuje BMPs, inhibitory, aktiviny, růstové a diferenciační faktory (GDFs), gliální neurotrofické faktory (GDNFs), anti-Müllerický hormon, levo-pravé determinační faktory (Lefty), nodální růstový diferenciační faktor (Nodal), tedy faktory, které hrají ústřední roli ve vývoji, diferenciaci, reparaci tkání a imunitních reakcích (Meno et al. 1996, Poniatowski et al. 2015). TGF- β s jsou pravděpodobně jediné růstové faktory secernované v neaktivní formě. Sekrece se děje ve dvou formách nazvaných krátký (SLC) a dlouhý latentní komplex (LLC), kdy je na SLC navázán ještě jeden z latentních TGF- β vážících proteinů (LTBPs). V komplexech je TGF- β vždy v konformaci s latentním asociovaným peptidem (LAP) (Hayashi a Sakai 2012). LAP chrání strukturu TGF- β a ovlivňuje jeho interakci s receptory. LTBPs hrají pravděpodobně roli v ukládání TGF- β do

extracelulární matrix interakcí například s fibronektinem. Aktivace SLC a LLC je zásadním regulátorem aktivity TGF- β a nastává několika různými způsoby. Jeden z mechanismů je změnou konformace latentních komplexů při interakci s buněčným povrchem a jeho integriny. Dalším mechanismem je štěpením pomocí enzymů, jako plazmin, elastázy, metaloproteinázy (MMP-9, MMP-2), které hydrolyticky štěpí LAP. V aktivaci TGF- β hrají roli i aktivní formy kyslíku, snížení pH, trombospondin-1 a další (Horiguchi et al. 2012). TGF- β 1 představuje 80- 90% TGF- β v kostní tkáni. Kostní tkáň je také specifická tím, že na rozdíl od jiných tkání, které většinu TGF- β produkují v LLC komplexu, téměř 50% TGF- β vytváří v krátkém komplexu, tedy SLC (Bonewald 1999). Signál celé superrodiny TGF- β je transdukován receptory I a II (T β RI, T β RII) typu s modulací receptory typu III. Vazba TGF- β je zprostředkována T β RII, který s T β RI vytvoří heterotetramerický komplex. Hlavní efekторы TGF- β signalizace jsou regulační tedy R-SMADs (SMAD2 a SMAD3), které váží SMAD4 (Co-SMAD). Komplex s SMAD4 je transportován do buněčného jádra a ovlivňuje transkripci. Efekt je závislý na interakci s inhibičními SMADs (I-SMADs – SMAD6 a SMAD7). Pro osteoblasty je důležitá také TGF- β signalizace, nezávislá na SMAD, aktivací MAPK. Obě tyto cesty mohou ovlivnit Runx2 a to zejména negativně. TGF- β je v kostní tkáni chemoatraktantem, obecným stimulatorem produkce extracelulární matrix osteoblasty a negativním regulátorem produkce matrix degradujících enzymů, ale i stimulatorem osteoklastů od jejich prekurzorů až po apoptózu. Při hojení kostní tkáně je TGF- β přítomen v trombocytech hematomu, je produkován všemi buňkami přítomnými v oblasti zlomeniny, poté jeho produkce klesá a opět stoupá od 7. do 14. dne, zejména v oblastech chondrogenní osifikace v měkkém svalku a je produkován MSC, osteoblasty, osteocyty, chondroblasty a chondrocyty (Poniatowski et al. 2015). Konkrétní efekt TGF- β závisí na stupni diferenciaci buněk i na samotné koncentraci TGF- β .

1.4.9 Kostní morfogenetické proteiny (BMPs)

Kostní morfogenetické proteiny (Bone morphogenetic proteins –BMPs), které umožnily reparaci kostní tkáně při implantaci demineralizované kostní matrix byly poprvé popsány Uristem (Urist 1965). BMP jsou rozděleny do 4 skupin. Protože BMP-2 a BMP-4 jsou si velmi podobné, tvoří skupinu. GDF-5 skupina obsahuje

růstové diferenciační faktory GDF-5, GDF-6 a GDF-7, které se podílejí na diferenciaci chrupavky a vazů. Skupina osteogenního proteinu 1 (OP-1, nyní BMP-7) zahrnuje BMP-5, BMP-6, BMP-7 a BMP-8. Do skupiny BMP-9 jsou řazeny BMP-9 a BMP-10. Pro vývoj, reparaci a remodelaci kostní tkáně jsou nejdůležitější BMP-2, BMP-4 a BMP-7. Ale i BMP-9 (GDF-2) a BMP-10 jsou schopny indukovat ektopickou formaci kostní a chrupavčité tkáně *in vivo* (Cheng et al. 2003). Signál je jako v celé TGF superrodině transdukován heterotetramerem receptorů I a II typu. Receptorů I typu je známo 7 a jsou nazvány receptory aktivinu podobná kináza 1-7 (ALK-1 až ALK-7). Receptory II jsou BMPR-II, ActR-II a ActR-IIb (Hausmann et al. 2014). Aktivací receptorů je signál přenášen zejména SMAD cestou, ale u BMP-2 byla popsána i aktivace MAPK. Osteoinduktivními BMPs je aktivován jeden z nejdůležitějších transkripčních faktorů osteogeneze Runt-related Transcription Factor 2 (Runx2). Regulace probíhá na úrovni extracelulárních antagonistů jako Noggin, Chordin, Sklerostin, Gremlin, Follistatin, ale další se váží přímo na BMP nebo kompetují o receptory. Na úrovni membrány pseudoreceptor BAMBI kompetuje s receptory I a II typu a tím negativně ovlivňuje přenos signálu. V cytosolu ale i buněčném jádře regulují přenos signálu I-SMADs a Smurfs. BMPs působí jako chemoatraktanty a hrají zásadní roli v diferenciaci. Odpověď buňky na stimulaci BMPs je rozdílná vzhledem ke stupni její diferenciace, délce stimulace a koncentraci dalších růstových faktorů. Například BMP-2 stimuluje produkci VEGF osteoblasty (Deckers et al. 2002), ale MSC stimuluje k sekreci PGF (Raida et al. 2006).

Lidské rekombinantní BMP-2 a BMP-7 jsou registrovány ke klinickému použití v USA, Evropě a Austrálii mimo jiné k potenciaci hojení pseudoartróz, posterolaterálních fúzí, ale jsou používány i off-label. V současné době jsou ke klinickým aplikacím používány koncentrace BMPs tisícinásobně převyšující fyziologické množství ve tkáních. Panují tedy obavy o bezpečnost použití BMPs nejen v režimu off-label použití, ale i v základních indikacích. Podání se jeví rizikové zejména pro možnou indukci malignity či nadměrného růstu ektopické kosti (Ong et al. 2010, Carragee et al. 2013, Drazin et al. 2014).

1.4.10 Kortikosteroidy

Kortikosteroidy obecně ovlivňují kostní metabolismus. Pro laboratorní účely, potřeby buněčná terapie i tkáňového inženýrství v expanzních i diferenciacích médiích je nejvíce používán dexametazon. Dexametazon je syntetický steroid schválený k použití humánní medicíně široce používaný jako léčivo s významným glukokortikoidním a zároveň s minimálním mineralokortikoidním efektem. Ve vztahu ke kosti je u kortikoidů je poukazováno zejména na jejich vedlejší nežádoucí účinky jako osteoporóza a aseptická nekróza kostí při dlouhodobém i krátkodobém užívání (Dilasio 2014). Ovšem konkrétní účinek na MSC, osteoprogenitory, osteoblasty a osteocyty je podobně jako u růstových faktorů závislý na dávce, stupni diferenciaci a schématu podávání (Wang et al. 2012). Účinek glukokortikoidů může být *in vitro* a *in vivo* protichůdný (Kim et al. 2007). *In vitro* je pravidelnou součástí kultivačních a různých diferenciacích medií. Dexametazon *in vitro* hraje významnou úlohu v zachování kmenových vlastností kultivovaných buněk. Výsledný efekt dexametazonu na MSC a primitivní progenitory je pravděpodobně ovlivněn autokrinními a parakrinními zpětnovazebnými účinky glukokortikoidů ovlivňujících transkripci a produkci růstových faktorů a cytokínů. Dexametazon ve vyšším dávkování může *in vitro* i *in vivo* negativně ovlivňovat imunomodulační vlastnosti MSC (Lieberman et al. 2007, Chen et al. 2014).

1.4.11 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová - vitamín C je nezbytný pro syntézu kolagenu. Účastní se jako kofaktor hydroxylace prolinu a lysinu. Kyselina askorbová je v buněčné terapii a tkáňovém inženýrství jedním ze suplementů medií pro expanzi či diferenciaci buněk (Adamzyk et al. 2013). Používány jsou i deriváty kyseliny askorbové. 2-fosfát kyseliny L-askorbové byl v nedávné době identifikován jako stimulant produkce HGF (Bae et al. 2015).

1.5 Buněčná terapie

Buněčná terapie (BT) dospělými kmenovými buňkami a tkáňové inženýrství (TI) se nyní rychle rozvíjí v mnoha oborech medicíny včetně rekonstrukční chirurgie

skeletu. TI je interdisciplinární obor aplikující principy biologie a inženýrství k vytvoření funkčních náhrad k obnovení, zachování či zlepšení funkce tkáně nebo i celého orgánu (Langer a Vacanti 1993). Tyto léčebné přístupy jsou založeny na experimentálních výsledcích, ale i klinických pozorováních, kde dospělé kmenové buňky jsou schopny zlepšit regeneraci poškozených tkání. MSC, které jsou jedním z typů dospělých kmenových buněk, nabízí i v ortopedii nejen úplně nové terapeutické možnosti, ale také zlepšení stávajících technik při léčbě vrozených vad (Kitoh et al. 2007), získaných i vrozených kostních defektů (Hernigou et al. 2005, Ganger et al. 2011), aseptických nekrotéz (Hernigou a Beaujean 2002, Hernigou et al. 2015), vazů, kožního krytu a také šlach (Sato et al. 2000, Kuo a Tuan 2008), chrupavek (Djouad et al. 2006), meziobratlových plotének (Richardson a Hoyland 2008) nebo i celých kloubů (Alhadlaq et al. 2004, Alhadlaq a Mao 2005, Haasper et al. 2008).

Na rozdíl od embryonálních kmenových buněk (ESCs), jejichž použití zůstává kontroverzním tématem a etickým problémem, MSC setrvávají v centru zájmu TI zejména pro schopnost rychlého růstu *in vitro*, imunomodulační a diferenciací kapacitu, genetickou stabilitu a jejich relativně jednoduché získávání.

V současnosti probíhá, či je vyhodnocována celá řada klinických studií zkoumajících použití MSC (www.clinicaltrials.gov). Pro klinické použití MSC je nutné nejenom dodržet zásady dobré výrobní praxe (good manufacturing practice - GMP), ale i všechny legislativní podmínky státu, na jejímž území tato humánní aplikace probíhá. Současný výzkum se soustřeďuje na přenesení slibných laboratorních výsledků do klinické praxe, při maximálně možné minimalizaci rizik pro pacienta.

Pro úspěšné klinické použití MSC v rámci BT i TI je důležitý spolehlivý, rychlý a reprodukovatelný zdroj s garantovanou kvalitou těchto buněk.

1.6 Stimulace hojení kostí pomocí MSC

MSC hrají zásadní roli v regeneraci kosti (Calori a Giannoudis 2011) nejen proto, že jsou schopny diferenciací do kost a chrupavku produkujících buněk, ale také že jsou pro své blízké i vzdálené okolí zdrojem růstových faktorů, cytokínů a v neposlední řadě se samy podílejí na novotvorbě cévního zásobení, kde mohou suplementovat endotelové buňky. Nejstarší zdokumentované použití MSC

proběhlo v rámci použití autologního kostního štěpu, kde jsou MSC přirozeně přítomny. Dalším způsobem stimulace hojení kosti buňkami je použití nativní kostní dřevě anebo také koncentrátů mononukleárních buněk získaných zpracováním kostní krve, které také MSC obsahují. Aplikace *in vitro* expandovaných MSC v rámci BT nebo TI za použití nosiče nebo i s použitím i jiných buněčných populací je v humánní medicíně nejmodernější metodou. Na zvířecích modelech jsou v posledních letech zkoumány také geneticky modifikované MSC prolougovaně produkující růstové faktory (Fu et al. 2014). Do současné doby nebylo použito geneticky modifikovaných MSC v klinickém experimentu.

1.6.1 Autologní kostní štěpy

Pravděpodobně první zmínka o použití kostního štěpu v literatuře pochází od Joba van Meek'rena z roku 1668 (Fleming et al. 2000). Od té doby se stalo použití kostních štěpů odebraných z lopaty kosti kyčelní zlatým standardem. Operací s použitím autologních kostních štěpů se provádí miliony ročně na celém světě (Bucholz 2002, Giannoudis et al. 2005). Využívá se osteokonduktivních i osteoinduktivních vlastností tohoto přirozeného nosiče obsahujícího i živé buňky, mezi kterými, i když s malou četností, jsou i MSC. Odběr autologního kostního štěpu je ovšem doprovázen komplikacemi a to až v 30% (Banwart et al. 1995, Ahlmann et al. 2002, Swan a Goodacre 2006). Tyto komplikace se projevují jako bolestivost v oblasti odběrového místa, poškození *n. cutaneus femoris lateralis*, krvácení a infekce. Další významnou nevýhodou je omezené množství materiálu, které je možné odebrat.

1.6.2 Kostní dřevě

Technicky nejméně náročným použitím MSC je aplikace samotné kostní dřevě. Významem kostní dřevě v hojení kosti na zvířecím modelu se zabýval například Burwell (Burwell 1964). V 70. letech minulého století bylo pozorováno, že ektopicky podaná kostní dřevě může vytvořit novou kostní tkáň (Friedenstein et al. 1968, Urist 1970). V roce 1980 Lindholm a Urist (Lindholm a Urist 1980) publikovali použití kostní dřevě spolu s kostní matrix. V roce 1986 Connolly a Shindell a poté další autoři (Connolly a Shindell 1986, Connolly et al. 1989,

Connolly et al. 1991, Hernigou a Beaujean 1997, Goel et al. 2005) úspěšně léčili pacienty s nezhojenými zlomeninami tibie perkutánní injekcí kostní dřeně. Tato technika byla použita i při léčbě paklobů u pacientů s nádorovými onemocněními (Healey et al. 1990). Slibné výsledky byly demonstrovány také při hojení jiných dlouhých kostí (Garg et al. 1993). Po předchozích úspěších byla rozšířena indikace perkutánního použití kostní dřeně i na iatrogenní pakloby, pakloby při segmentálním transportu kosti a pakloby při prolongačních osteotomiích (Siwach et al. 2001). Úspěšné využití kostní dřeně k osídlení a zlepšení přihojení alogenního strukturálního kostního štěpu u pediatrických i dospělých pacientů popsala řada autorů (Wientroub et al. 1989). V roce 2002 Hernigou a Beaujean prezentovali úspěšnou prospektivní studii se 116 pacienty léčenými dekompresí a aplikací autologní kostní dřeně u nektróz hlavic femurů (Hernigou a Beaujean 2002). Hernigou své výsledky potvrdil v další prospektivní studii na 534 nektrózách femuru (Hernigou et al. 2009). Nekcentrovaná kostní dřeň byla s rozporuplnými výsledky použita k perkutánní léčbě juvenilních kostních cyst (Wright et al. 2008, Zamzam et al. 2009). Transplantací kostní dřeně lze léčit, či zlepšit stav pacientů s genetickými onemocněními skeletu například u autozomálně recesivní osteopetrosy (Fath a Porras 1999) nebo osteogenesis imperfecta (Horwitz et al. 1999).

1.6.3 Koncentrovaná kostní dřeň

Koncentrovanou kostní dřeň použili Gangji a Hauzeur pro léčbu I-II stadia aseptických nektróz hlavice femuru (Gangji et al. 2004, Gangji a Hauzeur 2005, Gangji et al. 2005). Dále byla publikována prospektivní dvojité slepá studie s pětiletým sledováním, která potvrdila úspěšnost této metodiky (Gangji et al. 2011). V roce 2005 publikoval Hernigou (Hernigou et al. 2005) dobře dokumentovanou studii perkutánní aplikace 20ml koncentrátu z kostní dřeně (300ml) při léčbě 60 neinfikovaných atrofických pseudoartróz tibie. Analýzou odebrané kostní dřeně bylo nalezeno 612 ± 134 progenitorů v jednom ml. Navíc v této studii byla prokázána korelace mezi počtem implantovaných MSC a velikostí svalku, stejně tak se zhojením paklobu. U 7 pacientů, u kterých ke zhojení paklobu nedošlo, byla implantována celková dávka menší než 30000 MSC. Tato studie poukazuje na to, že množství MSC v aspirátu kostní dřeně, které bohužel nelze předem odhadnout, korelovala s úspěšností této metody a pravděpodobně

je pro hojení rozhodující (Hernigou et al. 2006). Hernigou svoje výsledky publikoval na rozsáhlém souboru 534 kyčlí u 342 pacientů s dobrými dlouhodobými výsledky (Hernigou et al. 2008). Koncentrovaná kostní dřev byla použita a u nekrotických hlavic femurů i dalšími autory (Yasunaga et al. 2007, Wang et al. 2010). Přes vylepšení metodiky koncentrace MSC zůstává počet těchto progenitorů ve zpracovaném materiálu limitován. Koncentráty kostní dřevě byly použity s úspěchem ve spojení s avitálními kostními štěpy v léčbě infikovaných paklobů (Ateschrang et al. 2009) a proximálních tibiálních osteotomiích (Dallari et al. 2007), kde zlepšily jejich vhojení.

1.6.4 Kultivované MSC

Mnoho autorů etablovalo kultivační postupy pro MSC (Friedenstein et al. 1974, Gronthos et al. 1994, Gronthos a Simmons 1995, Coelho et al. 2000, Chen et al. 2006, Mannello a Tonti 2007) nejenom pro laboratorní výzkum, ale nyní i pro klinické použití (Koc et al. 2000, Kawate et al. 2006). Snahou těchto metod je docílit kultivací *in vitro* většího a také garantovaného množství MSC. Takto vyrobených velkých počtů MSC je možno následně použít k implantaci. Většina současných kultivačních postupů využívá medií s přídavkem fetálního telecího séra (FBS) obsahujícího mimo jiné vysoké hladiny růstových faktorů. Použití FBS s sebou nese zejména riziko imunitních reakcí a dále teoretické riziko virové a prionové transmise (Selvaggi et al. 1997). Zohledníme-li také senescenci kmenových buněk pěstovaných v takto suplementovaných mediích (Wagner et al. 2009, Schallmoser et al. 2010), jeví se použití FBS jako méně výhodné. Tyto protokoly jsou navíc spojeny s vícečlenným pasážováním a tím i časovou náročností a zvýšeným množstvím kritických kroků ve výrobním procesu. Jelikož klinicky testované chemicky definované bezsérové medium s velkou výtěžností ještě neexistuje (Mannello a Tonti 2007), je snahou nalézt alternativu k FBS. Do současné doby se jako úspěšné ukázalo použití na destičky bohaté plazmy (PRP), destičkového lyzátu či uzpůsobení lidského séra. Samotné lidské sérum se pro dlouhodobou kultivaci MSC jeví jako nevhodné (Shahdadfar et al. 2005, Gregory et al. 2006), zejména proto, že navozuje senescenci buněk a jejich diferenciaci do adipocytů.

Použití autologního lidského séra nebo séra získaného z kostní dřeně pacienta naráží zejména na objemovou limitaci takového media zejména pro kultivaci většího množství MSC.

Byly publikovány slibné výsledky kultivací s použitím alogenního destičkového lyzátu (Schallmoser et al. 2008) či plazmy bohaté na destičky (PRP) (Bernardo et al. 2007, Kocaoemer et al. 2007). Mezi hlavní růstové faktory, které trombocyty obsahují, patří EGF, FGF-2, všechny formy PDGF, TGF- β 1 a IGF (Doucet et al. 2005, Schallmoser et al. 2007). Obsah růstových faktorů v trombocytech se však liší, nejen mezi jednotlivými dárci, ale i u jednoho dárce v průběhu dne. Samotný počet trombocytů v plazmě také výrazně kolísá. Pro reprodukovatelnost výsledků je nutné mísit trombocyty od několika dárců, což zvyšuje riziko imunitních reakcí a přenosu infekcí.

V klinice *in vitro* expandované MSC byly aplikovány spolu s PRP do regenerátů prolongačních osteotomií tibií a femuru a byla prokázána stimulace a akcelerace hojení (Kitoh et al. 2009). K těmto závěrům autoři došli na základě předešlých klinických experimentů (Kitoh et al. 2004, Kitoh et al. 2007).

V rámci experimentu před zavedením legislativy pro buněčnou terapii byly úspěšně MSC expandovány a prediferencovány na hydroxyapatitových granulích a použity jako náhrada spongiózních kostních štěpů u výplně kavit při léčbě nezhoubných nádorů. Expandované MSC na nosičích byly použity v orofaciální rekonstrukční chirurgii s ne plně předvídatelným efektem (Meijer et al. 2008). Yamada a kol. popsal úspěšné použití při augmentaci horní čelisti s použitím preexpandovaných autologních MSC z kostní dřeně v PRP gelovém nosiči na souboru 104 pacientů (Yamada et al. 2013).

V dalším experimentu bylo použito MSC k léčbě nektróz hlavic kostí stehenních s podobným úspěchem jako kostní dřeně (Zhao et al. 2012). Kim publikoval v roce 2009 multicentrickou randomizovanou studii s použitím autologních kultivovaných osteoblastů získaných osteogenní kultivací- diferenciací kostní dřeně (Kim et al. 2009)

Na základě dobrých experimentálních klinických výsledků (Horwitz et al. 2002, Otsuru et al. 2012) probíhá vyhodnocování fáze I klinické studie s opakovaným podáváním alogenních MSC dětským pacientům s osteogenesis imperfekta typ II a III (NCT01061099).

Počet klinických studií s aplikací kultivovaných MSC či mononukleární frakce kostní dřeně v registrech klinických studií přesahuje 200 (www.clinicaltrials.gov, www.who.int/ictrp, www.clinicaltrials.gov). Výsledky s aplikací pro regeneraci kostní tkáně jsou publikovány v současné době pouze u 1 randomizované studie fáze I (bezpečnost) u zlomenin tibie s perkutánní aplikací kultivovaných MSC smíšených s PRP a demineralizovanou kostní matrix. V této studii došlo v souboru 24 pacientů ke zkrácení mediánu času hojení z 3 měsíců u kontrolní skupiny na 1,5 měsíce ve skupině s MSC (Liebergall, Schroeder et al. 2013). U dalších registrovaných studií však v současné době zveřejnění výsledků chybí.

1.6.5 Separované cirkulující MSC

Na přelomu tisíciletí se vyskytly od několika autorů teorie a první důkazy o existenci cirkulujících buněk v periferní krvi s MSC charakteristikou (Huss et al. 2000, Zvaifler et al. 2000). Nejpoužívanější metody separace mononukleárních buněk periferní krve jsou hustotní gradientové centrifugace nebo aferézní separace. Hustotní gradientová centrifugace je používána pro experimentální účely a její výtěžky jsou ve srovnání se separátorem velmi nízké. Separátorem lze bezpečně získat velké množství periferních mononukleárních buněk (Brauninger et al. 2012). Buňky s MSC charakteristikami jsou zastoupeny v nízkém počtu, proto po separaci je nutná pozitivní, či negativní selekce MSC z mononukleárních buněk, například pomocí MACS (Magnetic bead Activated Cell Sorting). Na rozdíl od dalších metod získávání MSC je separace z periferní krve minimálně invazivní. Pro použití pro klinické účely u neortotopických aplikací jsou ovšem nutné další preklinické studie k prokázání multipotence a zejména bezpečnosti (Zhang a Huang 2012).

1.7 Nosiče

Současná legislativa prozatím neumožnila standardní klinické použití umělé náhrady kosti osídlené lidskými buňkami. V experimentech na zvířecích modelech při náhradě kosti jsou testovány různé nosiče. Existuje nespočet různých

materiálů, ze kterých jsou nosiče vyráběny v zásadě lze rozdělit do 3 skupin: syntetické polymery (na bázi laktidu (PLLA, PDLLA), či glykolu (PGA) a další), přírodní vysokomolekulární nosiče (kolagen, chitosan, agrekan), keramické materiály (hydroxyapatit, trikalciumfosfát) nebo jejich kompozity (Sundelacruz a Kaplan 2009). Biokompatibilita nosiče je samozřejmým předpokladem ke klinickému použití takového systému. Jak materiál, tak i jeho potenciální rozpadové produkty musí být netoxické nejen pro buňky a tkáně v okolí, ale i pro vzdálené orgány, stejně tak nesmí způsobovat lokální zánětlivou reakci. Buňky musí být schopny se na povrch nosiče navázat, migrovat, diferencovat se, plnit svoji biologickou funkci, tedy i vytvářet extracelulární matrix a interagovat s okolní tkání. Fyzikální vlastnosti nosiče pro reparaci kostěných struktur by měly být velmi podobné kosti. Pevnost, která umožní stabilitu reparované části skeletu a zároveň mechanickou oporu buňkám použitým k hojení kostní tkáně. Současně by měl být takový materiál pružný, tak aby umožnil mechanickou stimulaci buněk při diferenciaci v osteoblastovou linii. Dále by fyzikální vlastnosti nosiče měly umožnit snadnou manipulaci při implantaci a to bez poškození buněk na povrchu či uvnitř nosiče. Struktura a vnitřní architektura nosiče je neméně důležitá, musí umožnit nejenom migraci buněk, ale i vrůstání cév. Vnitřní meziprostory nosiče musí být spojitě a dostatečně veliké, aby umožnily ukládání extracelulární matrix. Propojení vnitřních prostor je důležité nejenom z hlediska látkové výměny buněk, tedy přísunu živin a transportu odpadních produktů, ale také pro umožnění eliminace rozpadových produktů samotného nosiče. Zvýšená koncentrace rozpadových produktů nosiče může *in vivo* způsobit lokální reakci, či cytotoxicitu nebo nežádoucí urychlení odbourávání nosiče. V ideálním případě by měl nosič být beze zbytku vstřebatelný, tak aby byla umožněna kostní přestavba a plné nahrazení novou autologní tkání.

Nosiče buněk na bázi polymerů kyseliny mléčné, lze vyrábět různými technologickými postupy, které umožňují také vysokou pevnost a porositu takového nosiče. Tyto materiály lze poměrně snadno upravovat do různých tvarů. Změnou chemické struktury a vnitřní architektury nosiče lze ovlivnit rychlost degradace. Polylaktidové nosiče jsou schopny po omezenou dobu poskytnout mechanickou podporu buňkám i nově vznikající tkáni. Degradace polylaktidových nosičů probíhá hydrolyzou. Tyto materiály se zdají být perspektivní zejména v regenerační medicíně kosti.

1.8 Model NOD/LtSz-Rag1⁻ pro in vivo experiment

Pro pokusy *in vivo* s lidskými MSC u kterých předpokládáme nejen jejich parakrinní působení, ale diferenciaci těchto buněk je nutno zvolit zvířecí model, který nejen bude tolerovat MSC, ale i buňky vzniklé jejich diferenciací, proto byl zvolen NOD/LtSz-Rag1⁻ model. Tento myší kmen s kombinovaným vážným imunodeficitem se vyznačuje neschopností vytvářet funkční T a B lymfocyty pro deficienci rekombinaci aktivujícího genu a chyběním imunoglobulinů v séru a nízkou aktivitu NK buněk po celou dobu života. Tyto myši mají oproti NOD/LtSz-scid delší délku přežití z důvodu pozdějšího vývoje lymfomu (Shultz et al. 2000) a také jsou radiorezistentní. NOD/LtSz-Rag1⁻ model přihojuje lidské MSC i hematopoetické kmenové buňky, periferní monocyty a lidskou pupečnickovou krev (Shultz et al. 2000).

1.9 Legislativa

Použití MSC v medicíně je ve vyspělých zemích přísně regulováno. V USA je třeba se řídit doporučeními Food and Drug Administration (FDA) (Halme a Kessler 2006) (www.fda.gov). Pro Českou republiku jsou závazná nařízení vydávaná Evropská lékovou agenturou (www.ema.europa.eu) vycházející z článku 17 nařízení evropského parlamentu a rady ES č.1394/2007, kde prostředníkem je Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL). Užití pokročilé buněčné terapie a tkáňového inženýrství se musí řídit pravidly pro produkty pokročilé terapie - **Advanced-therapy Medicinal Products (ATMP)**. Zda konkrétní terapie bude zařazena do kategorie ATMP a splňuje všechny požadavky kladené na ATMP rozhoduje komise pro pokročilé terapie - **Committee for Advanced Therapies (CAT)**. CAT rozhoduje zejména, zda buňky splňují kritéria pro minimální manipulaci a jestli jsou buňky použity ve smyslu jejich základní funkce. Samotná výroba musí dodržet zásady dobré výrobní praxe GMP. GMP je celý systém kontroly a řízení výroby a kvality testování kontroly medicínálních výrobků, zahrnující požadavky na prostory, vybavení, značení, kvalifikaci personálu, skladování, transport, dokumentaci a další (www.picscheme.org). Finanční náklady i časové nároky ATMP jsou proto velmi vysoké. S rozvojem ATMP se

očekává sjednocení výrobních postupů a zejména sjednocení kritérií pro expedici a testů účinnosti. I když výše uvedené regulace na jedné straně brání rychlému a masovému použití ATMP v klinické praxi, na druhé straně vedou k důslednému preklinickému výzkumu k zajištění maximální bezpečnosti a spolehlivosti ATMP pro pacienta.

2 Hypotézy a cíle práce

Zlepšení regenerace skeletálních struktur patří k dlouhodobým cílům Kliniky dětské a dospělé ortopedie a traumatologie 2. LF UK a FN Motol. MSC hrají ústřední roli v regeneraci kostní tkáně. MSC získané expanzí buněk kostní dřeně, by měly ve vybraných indikacích potencovat hojení kosti. Takovýto způsob stimulace hojení kosti by mohl omezit nutnost použití autologního kostního štěpu.

Hlavním cílem projektu je příprava nové technologie buněčné terapie potenciálně využitelné v ortopedické klinické praxi, čehož má být dosaženo posupnými kroky:

- 1) Získání MSC a jejich kultivace, charakterizace a diferenciacce
- 2) Analýza adherence, kultivace a diferenciacce MSC na plochých polylaktidových nosičích *in vitro*.
- 3) Analýza kultivace a diferenciacce MSC na trojdimenzionálních vláknitých polylaktidových nosičích *in vitro*.
- 4) Implantace MSC osazeného nosiče *in vivo* na myším (NOD/LtSz-Rag1-) modelu.

3 Metodika

3.1 Odběr MSC

Dárci MSC byli pacienti podstupující diagnostickou či stagingovou trepanobiopsii pro hematologické onemocnění na 1. Interní klinice -hematologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Všichni dárce byli řádně poučeni a poskytli informovaný souhlas. Odběr 10 ml kostní krve bylo provedeno z oblasti *spina iliaca posterior superior*.

3.2 Zpracování kostní krve

Kostní krev bezprostředně po odběru byla rozředěna ve sterilní odběrové nádobce v poměru 1:1 s Hanksův solný roztok (Hanks' balanced salt solution (HBSS) (Gibco, Invitrogen division, Paisley, Skotsko)) s přídavkem 3 kapek Heparinu od firmy ZENTIVA (Česká republika) a transportována do prostor laboratoře experimentální buněčné terapie 1. interní kliniky - hematologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Vzorek byl následně zaevidován do dokumentace a v případě neporušení přijat k dalšímu zpracování. Veškeré úkony, při kterých bylo s živými buňkami manipulováno probíhaly v nádobách opatřených popisem materiálu a to v laminárních boxech třídy B za sterilních kautel. Rozředěný vzorek s přídavkem heparinu byl navrstven opatrně na 10 ml Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Švédsko) ve sterilní centrifugační zkumavce. Centrifugace probíhala při 4020 otáčkách na Ficoll gradientu 30 minut s rozběhem č. 5 a bržděním č. 1. V laminárním boxu byla vzniklá mononukleární vrstva buněk obezřetně a frakcionovaně odebrána pipetou tak, aby nedošlo k promísení vrstev. Následně byly buňky resuspendovány ve 20 ml HBSS. Pokud měla probíhat expanze ve 2 různých mediích, tak byl vzorek rozdělen po 10ml. Suspenze takto odebraného materiálu byla centrifugována při 3120 otáčkách 15 minut rozběhem č. 5 a bržděním č. 5. Následně byl vzorek resuspendován ve 2ml základního média ve kterém měla následně probíhat kultivace. Na certifikovaném hemocytometru bylo

poté analyzováno 200 µl vzorku a stanoven počet buněk. Takto zpracovaná nukleární složka kostní krve byla poté nasazena v požadovaném množství na kultivační materiály.

3.3 Media a suplementy

Medium schválené pro klinické účely CellGro™ bylo zakoupeno od firmy CellGenix (Freiburg, Německo). Medium pro výzkumné účely alpha-MEM, EDTA-trypsin, glutamin, antibiotika a fetální telecí sérum (fetal bovine serum (FBS)), fosfátový pufr (phosphate-buffered saline (PBS)) a Hanksův solný roztok (Hanks´ balanced salt solution (HBSS)) byli zakoupeny od Gibco (Invitrogen division, Paisley, Skotsko). Ficoll-Paque™ PLUS byl koupen od GE Healthcare Bio-Science AB (Uppsala, Švédsko). Dexametazon byl koupen od Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo), rekombinantní lidský insulin ke klinickým účelům od Eli Lilly (Praha, Česká republika), kyselina askorbová od firmy Biotica (Praha, Česká republika). Rekombinantní lidské růstové faktory: epidermální růstový faktor (EGF), destičkový růstový faktor BB (PDGF-BB) byly koupeny od BD Biosciences (Bedford, Massachusetts, USA), kolonie stimulující faktor (CSF-1 či také M-CSF) a fibroblastový růstový faktor 2 (FGF-2) od firmy R&D (Minneapolis, Minnesota, USA). Růstové faktory byly rekonstituovány s lidským albuminem pro klinické účely ve fyziologickém roztoku od firmy Baxter AG (Viedeň, Rakousko). Poolované lidské sérum (HS) bylo získáno smícháním 5 jednotek AB Rh negativní plazmy, zakoupených od Ústavu hematologie a krevní transfúze (Praha, Česká republika), jejich následnou rekalifikací 0,1 mol CaCl₂ a filtrací přes membránu 0,22 µm. Aliquoty byly skladovány v -80°C do doby použití.

3.4 Standardní primární kultivace MSC

Buňky byly nasazovány v počtu 10⁵/cm² kultivační láhve (TPP, Trasadingen, Švýcarsko) do 10ml media na bázi alpha-MEM. Standardní medium bylo připravováno v laminárních boxech do sterilních lahví 250ml značených dnem

přípravy a obsahovalo alpha-MEM s 10% FBS, 2 mmol glutaminu, s antibiotiky a antimykotikem (PNC G + Streptomycin + Amfotericin B). Kultivační medium bylo uchovááno bylo v chladničce s kontrolovanou teplotou a spotřebováno do 14dní. Po 24 h od nasazení bylo medium odpipetováno a neadherující buňky odstraněny oplachem 10 ml PBS. Poté bylo přidáno 10ml čerstvého kultivačního média. Výměna kultivačního média probíhala 2x týdně. Standardní doba kultivace byla 2-6 týdnů v inkubátorech za standardních sledovaných podmínek (5% CO₂, 37 °C). Kultury byly po odstranění média opláchnuty PBS. Sklizení adherentních buněk probíhalo 2-5ml 0.25% EDTA s 1% trypsinem, kdy inkubace probíhala 10minut v inkubátoru (5% CO₂, 37 °C). Po inkubaci bylo pod mikroskopem zkontrolováno, zda došlo k odloučení buněk. Pokud došlo k neúplnému odloučení buněk byly přidány 2ml 0.25% EDTA s 1% trypsinem a opakována inkubace. Účinek trypsinu byl inaktivován buď kultivačním mediem bez FBS či s přídavkem FBS dle dalšího záměru pokusu. Vzorek byl centrifugován při 3120 otáčkách 15 minut rozběhem č. 5 a bržděním č. 5 a resuspendován v kultivačním mediu bez FBS či s přídavkem FBS.

3.5 Kokultivace MSC s alogenními monocyty periferní krve

MSC z primární expanze byly nasazovány v počtu 10⁵ do 5 jamek z 6 jamkové misky (TPP, Trasadingen, Švýcarsko) do 2ml standardního media do všech jamek, tedy alpha-MEM s 10% HS, 2 mmol glutaminu, s ATB/ATM (PNC G, Streptomycin, Amfotericin B). Po 24 h od nasazení bylo medium odpipetováno a neadherující buňky odstraněny oplachem 10 ml PBS. Poté bylo přidáno 2ml čerstvého kultivačního média do všech jamek. Do jamek byly přidávány mononukleární buňky periferní krve. Dárcům periferní krve bylo sterilně odebráno 50ml krve po předešlém podpisu informovaného souhlasu. Mononukleární buňky periferní krve (MNC) byly připraveny obdobným způsobem na Ficoll gradientu jako MSC, počet mononukleárních buněk byl stanoven na hemocytometru. Monocyty byly následně nasazeny v počtu 0,05x10⁶ 1. jamka, 0,2x10⁶ 2. jamka, 0,5x10⁶ 3. jamka, 1,0x10⁶ 4. a 6. jamka. Jako kontrola sloužila 5.jamka, kde byly pouze MSC a 6. jamka pouze mononukleární buňky periferní krve (Schéma č. 1, str. 37).

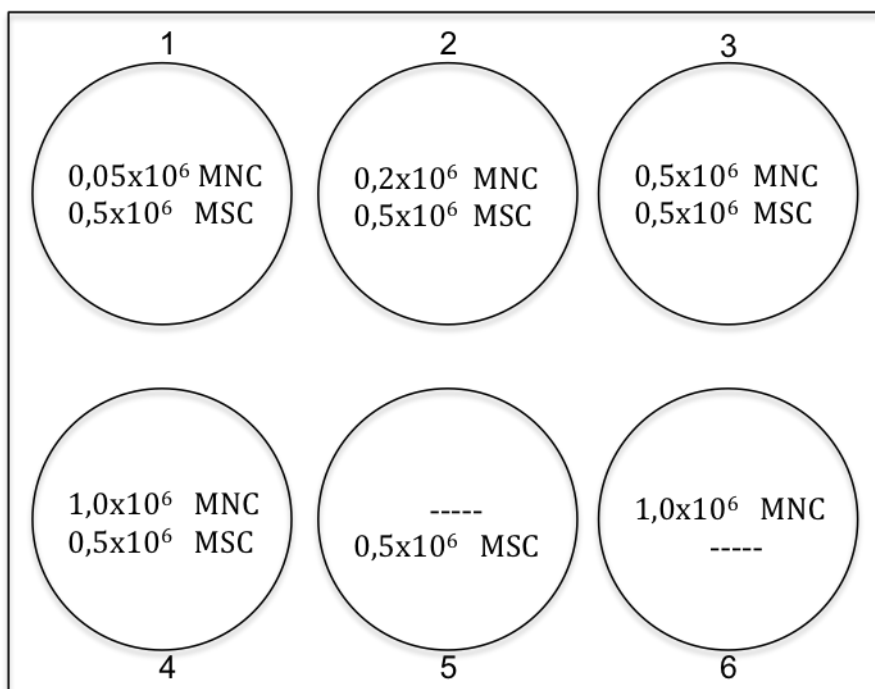


Schéma č. 1: Schéma počtu MSC a mononukleární buňky periferní krve (MNC) při nasazení do 6 jamkových kultivačních destiček. Jako kontrola sloužila 5. jamka (pouze MSC) a 6. jamka pouze MNC.

Za 24h od nasazení nukleárních buněk periferní krve bylo medium odpipetováno a neadherující buňky opatrně odstraněny oplachem 2 ml PBS. Výměna kultivačního média dále probíhala 2x týdně. Standardní doba kultivace byla 2 týdny v inkubátorech za standardních sledovaných podmínek (5% CO₂, 37 °C). Kultury byly po odstranění média opláchnuty PBS a obarveny krystalovou violetí (0.5% roztok ve 100% metylalkoholu).

3.6 MSC kultivace ke klinickému použití

Kultivace probíhala podle patentu (EU 1999250, ČR 301 141 Způsob pěstování lidských mezenchymových kmenových buněk, zejména pro léčbu nehojících se fraktur, a bioreaktor k provádění tohoto způsobu Pytlík R, Kobylka P, Rypáček P, Stehlík D, Trč T, et al.). Medium pro expanzi MSC bylo založeno na CellGro™ mediu s 10% HS, 1% penicilin a streptomycinu, insulinu (0.25 IU/ml), dexametazonu (0.01 μmol), kyselině askorbové (100 μmol), EGF (10 ng/ml), PDGF-BB (100 ng/ml), M-CSF (25 ng/ml) a FGF-2 (1 ng/ml). Kultivace probíhala

buď v kultivačních láhvích 75cm² (TPP, Trasadingen, Švýcarsko) či RoboFlasks™ (Corning, Acton, Massachusetts). Nádoby RoboFlasks™ s kultivační plochou 92,6cm² jsou certifikovány pro klinické použití, jsou opatřeny porty, jak pro výměnu plynů, tak porty umožňujícími přidávání suplementů se silikonovými membránami pro použití v uzavřeném systému. V těchto případech neadherentní buňky nebyly odmyty, byly kokultivovány a medium nebylo měněno po celé 2 týdny. Suplementy byly přidávány porty pro injekční aplikaci dvakrát týdně. Po dvoutýdenní kultivaci bylo z kultivačních nádob odstraněno kultivační medium spolu s neadherentními buněčnými populacemi. Kultury byly opláchnuty 10ml roztokem PBS, který odstranilo většinu zbytku neadherentních buněk. Adherentní populace byly sklizeny 5ml 0,25% EDTA s 1% trypsinem uzavřeným způsobem. Tedy po 10 minutové působení trypsinového roztoku v inkubátoru (5% CO₂, 37 °C) byla kontrolována separace buněk pod světelným mikroskopem. Pokud nedošlo k úplnému odloučení buněk byl trypsinový krok opakován. Trypsin byl inaktivován samotným přídatkem kultivačního media bez HS či s jeho přídatkem, tak jak vyžadovaly další postupy experimentu. Buněčný produkt byl odstředěn v centrifuze při 3120 otáčkách 15 minut rozběhem č. 5 a bržděním č. 5. a resuspendován v PBS, kultivačním mediu s HS nebo bez HS. Následovalo neprodlené další zpracování buněk.

3.7 Stanovení počtu MSC po primární expanzi

Po primární expanzi ať již standardní, či metodou určenou ke klinickému použití, byly neadherentní buňky pečlivě odmyty a sklizeny na plast adherentní populace buněk. Pro výpočet množství MSC bylo nutno nejprve stanovit celkový počet sklizených buněk (n). Buňky z primární expanze po centrifugaci byly resuspendovány ve 2ml PBS, poté byl odebrán vzorek 200 µl k rozboru, pipetou v laminárním boxu. Zbytek buněk použit k další analýze či dalšímu kroku experimentu.

Vzorek byl analyzován na hemocytometru Beckman-Coulter AcTdiff2 (Fullerton, Kalifornie, USA). Pro samotné určení procentuálního zastoupení MSC bylo nutno určit pozitivitu antigenních struktur buněčného produktu pomocí průtokové

cytometrie na přístroji FACSCalibur (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, Kalifornie, USA). Pro přípravu buněk pro průtokovou cytometrii bylo použito 100.000 buněk ve 100 µl PBS, kam byly přidány protilátky a inkubovány 30minut za pokojové teploty bez přístupu světla. Po inkubaci byly vzorky zředěny 100 µl PBS a před samotnou analýzou promíchány. Byly použity tyto protilátky proti znakům bílé krevní řady (anti-CD45) a červené krevní řady (anti-CD235a) (DakoCytomation, Brno, Česká republika). Dále byly značeny buňky 7-AAD (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Buňky, které nejevily pozitivitu 7AAD byly považovány za viabilní. Subpopulace buněk, která se neznačila CD45 ani CD235a byla pokládána za MSC. Za pozitivitu pro daný znak byla považována fluorescence větší než 0,5% kontroly.

Samotný výpočet množství MSC byl prováděn dle vzorce:

$$MSC = \frac{(n) \times (\%CD45^{neg} CD235a^{neg} 7AAD^{neg})}{100}$$

3.8 Antigenní analýza buněk primární expanze

Pro další specifikaci buněčného produktu z různých primokultivací byla uskutečněna průtoková cytometrie na přístroji FACSCalibur (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, Kalifornie, USA). Obdobně jako pro stanovení množství MSC bylo použito 100.000 buněk na jednu analýzu ve 100 µl PBS a inkubováno 30minut za pokojové teploty bez přístupu světla. Po inkubaci byly vzorky zředěny 100 µl PBS a před samotnou analýzou promíchány. Bylo použito následujících protilátek proti: CD11b FITC, CD18 PE, CD29 PE, CD44 FITC, CD90 FITC, CD106 PE, CD117 PE, CD166 PE (BD Biosciences Pharmingen, Erembodegem, Belgie), CD11c FITC, CD14 FITC či PE, CD34 PE, CD45 FITC či PE, CD49a FITC, CD49d FITC, CD63 PE, CD71 FITC, CD105 FITC and PE, HLA-(A, B, C, DR, DP, DQ) (DakoCytomation, Brno, Česká republika), CD49c FITC, CD49e FITC, ALP biotinylovaná, CXCR4 PE, (R&D Systems). Streptavidin-PE byl zakoupen u Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo) a isotypové kontroly IgG₁ FITC, IgG₁ PE, IgG_{2b} FITC, IgG_{2b} PE and IgG₁ PE-Cy5 u

DakoCytomation (Brno, Česká republika). Jako buňky pozitivní pro daný antigen byly stanoveny buňky s fluorescencí větší než horních 5% kontroly.

3.9 Stanovení BMP 2, BMP 7 a osteokalcinu

Ke stanovení positivity BMP 2, BMP 7 a osteokalcinu v buňkách primární expanze byla použita průtoková cytometrie na zařízení FACSCalibur (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, Kalifornie, USA) v 3-kanálovém režimu. Trypsinem sklizené kultury byly resuspendovány v PBS s 2% FBS a permeabilizovány pomocí Intrastain kit od firmy DakoCytomation (Dánsko). Protilátky anti-Human BMP-2 a anti-Human BMP-7 obě biotinylované byly zakoupeny od firmy PeproTech (Rocky Hill, New Jersey, USA). Anti-osteokalcin PE (clone 190125) a anti-ALP (clone B4-78 - biotinylovaná) byly zakoupeny od R&D Systems (Minneapolis, USA). Pro liniově specifický kanál (Lin) byla použita protilátka anti-CD45 PE-Cy5 (clone T29/33) od firmy DakoCytomation (Dánsko). Detekce biotinylovaných protilátek byla prováděna pomocí streptavidin-FITC od firmy R&D (Minneapolis, USA). Jako kontroly byly použity Isotypové imunoglobuliny IgG1 FITC, IgG1 PE, IgG2b FITC, IgG2b PE a IgG1 PE-Cy5, které byly zakoupeny u firmy DakoCytomation (Dánsko). Jako pozitivní nález byly pokládány buňky s fluorescencí větší než horních 5% kontroly.

3.10 Průkaz diferenciační schopnosti primokultivací MSC

Schopnost trilineární diferenciace je jedním ze základních znaků MSC. MSC dle definice mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii musí být schopny diferenciace do osteogenní, adipogenní a chondrogenní linie (Dominici et al. 2006). Diferenciace byla prováděna standardními postupy. Diferenciační pokusy byly prováděny jak u MSC kultivovaných standardní metodikou tak i u MSC pěstovaných způsobem pro klinické použití.

3.10.1 Osteogenní diferenciac

MSC z primární expanze byly nasazeny v množství 10^4 MSC/cm² do 10ml osteogenního media. Samotné osteogenní medium obsahovalo α MEM s 10% FBS, 10 mmol β -glycerol fosfátu, 0,5 mmol fosfátu kyseliny askorbové a 0,1 μ mol dexametazonu s ATB/ATM (PNC G, Streptomycin, Amfotericin B). Osteogenní medium bylo připravováno v laminárních boxech za sterilních kautel do sterilních lahví 250ml značených štítkem a dnem přípravy. Uchovávalo se stejně jako jiná media v chladničce k tomuto účelu vyhrazené, s kontrolovanou teplotou a spotřebováno bylo do 14 dní. Výměna osteogenního média probíhala 2x týdně. Standardní osteogenní kultivace probíhala 2-4 týdny. Vždy před výměnou média byla provedena vizuální kontrola pod mikroskopem Olympus s možností fotodokumentace. Na závěr diferenciac bylo provedeno barvení podle von Kossa a barvení na alkalickou fosfatázu.

3.10.1.1 Barvení podle von Kossa

Barvením von Kossa je možno barvit deposita hydroxyapatitu v kulturách. Ionty stříbra fotochemickou reakcí s fosforem vytvářejí stříbro. Existuje řada modifikací, v těchto pokusech byly nejprve kultury fixovány 96 % etanolem po dobu 15 minut, poté opláchnuty opakovaně vodou pro tkáňové kultury. Poté byl přidán 3% roztok dusičnanu stříbrného ve vodě pro tkáňové kultury. Poté byly nádoby s kulturami ponechány 30 minut na denním světle, kde probíhala fotochemická reakce. Následně byly vzorky opláchnuty vodou pro tkáňové kultury. Reakce byla ustálena 5% roztokem thiosíranu sodného ve vodě pro tkáňové kultury po dobu 2 minut. Následoval oplach vodou. Některé vzorky byly následně dobarveny jádrovou červení po dobu 5 minut.

3.10.1.2 Barvení na alkalickou fosfatázu

Pro průkaz alkalické fosfatázy (ALP) byl použit set od Sigma-Aldrich (Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit). Přítomnost ALP se projevuje vznikem deposit modrého nerozpustného barviva. Modrá granulární deposita vznikají reakcí naftol-As-Bi alkalického roztoku s fast blue RR solí za přítomnosti alkalické fosfatázy. Nejprve z kultur bylo odstraněno kultivační medium a proběhlo opláchnutí TRIS pufrem, který byl vyroben z 1tbl rozpuštěné v 15ml vody pro

tkáňové kultury. Před samotným barvením probíhala fixace 4% paraformaldehydem po dobu 10 minut, roztok byl poté opláchnut vodou pro tkáňové kultury. Čerstvě promísený barvicí roztok obsahující 300 μ l roztoku nitritu sodného a 300 μ l roztoku s fast blue RR z kitu v 11,25ml vody pro tkáňové účely s přídatkem 300 μ l naftol-As-Bi alkalického roztoku. Barvicí roztok byl přidán do kultur ve stejném množství, jako byl objem kultivačního media. Inkubace probíhala 15 minut při pokojové teplotě bez přístupu světla. Poté byl roztok odstraněn a kultury dle potřeby dobarveny neutrální červení po dobu 1 minuty. Preparáty byly poté opláchnuty vodou pro tkáňové kultury a vyhodnocovány mikroskopem a provedena fotodokumentace.

3.10.2 Adipogenní diferenciac

Adipogenní diferenciac byla prováděna kultivací střídavě v indukčním a udržovacím adipogenním mediu. Nejprve MSC z primární expanze byly nasazeny v množství 10^4 MSC/cm² do 10ml indukčního media. Indukční medium obsahovalo alpha-MEM s 10% FBS, 2 mmol glutaminu, 1% penicilinu a streptomycinu, 1 μ mol dexametazonu, 0,2 mmol indometacinu, 0,01 mg/ml insulinu a 0,5 mmol 3-isobutyl-l-methyl-xanthinu. Udržovací medium alpha-MEM s 10% FBS, 2 mmol glutaminu, 1% penicilinu a streptomycinu a 0,01 mg/ml insulinu. Medium bylo měněno dvakrát týdně. Před výměnou média byly kultury vizuálně kontrolovány pod mikroskopem Olympus a dle potřeby prováděna fotografická dokumentace. Kultivace trvala standardně 4 týdny. K průkazu tuků bylo použito barvení olejovou červení. Olejová červeň, v tuku rozpustné barvivo, slouží k průkazu neutrálních triglyceridů a tuků. Kultury byly opláchnuty 10ml PBS, poté inkubovány 5 minut v 50 % etanolu. Samotné barvení nasyceným roztokem olejové červeně v 70% etanolu probíhalo 20 minut. Ihned poté byly vzorky opláchnuty nejprve 50 % etanolem a následně vodou pro tkáňové kultury. Následovalo neprodlené zhodnocení a digitální fotodokumentování pomocí světelného mikroskopu Olympus s příslušenstvím.

3.10.3 Chondrogenní diferenciacie

Chondrogenní diferenciacie byla indukována alpha-MEM s 50 ng/ml TGF- β 1 nebo CellGro™ médiem s FGF-2, PDGF-BB, EGF a TGF-b1 nasazením a agregací 10^6 MSC v kónických zkumavkách Sarstedt (Nümbrecht, Německo). Mikromasy byly po 2 týdnech kultivace fixovány, krájeny a barveny hematoxylin-eozinem, toluidinovou modří a protilátkami proti kolagenu II. Histologická a imunohistochemická analýza byla provedena v Ústavu histologie a embryologie (Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové)

3.11 PLLA/PDLLA nosiče

Nosič buněk pro reparaci kostěných struktur by měl mít fyzikální vlastnosti podobné kosti. Pevnost, aby poskytl mechanickou oporu buňkám reparujícím kostní tkáň. Zároveň by měl být takový materiál pružný, tak aby umožnil mechanickou stimulaci buněk při diferenciaci v osteoblastovou linii. V ideálním případě by měl být vstřebatelný, tak aby umožnil kostní přestavbu a plné nahrazení novou autologní tkání. Nosiče na polylaktidovém podkladě jsou jednou z možností. Nejprve bylo nutno potvrdit schopnost MSC na takových materiálech růst a diferencovat se. Proto byly jako první vytvořeny ploché povrchy a poté 3D vláknité nosiče. Samotné nosiče byly vyrobeny v Institutu makromolekulární chemie Akademie věd České republiky.

3.11.1 Ploché PLLA/PDLLA nosiče

Pro výrobu plochých nosičů byl syntetizován vysokomolekulární poly(L-laktid) (PLLA) a poly(D,L-laktid) (PDLLA).

Monomer L-laktid (3S-cis-3,6-dimethyl-1,4-dioxan-2,5-dion, od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo) byl nejprve opakovaně čištěn krystalizací z roztoku rozpouštědel ethylacetát/toluen. Krystalický monomer byl vysušen ve vakuu.

Vnitřní povrchy skleněné polymerizační ampule byly silanizovány reakcí s dimethylchlorsilanem. Ampule poté byla vymyta hexanem a vysušena ve vakuu za žihání. Do ampule bylo pod inertní atmosférou nadávkováno 25 g krystalického

L-laktidu a 370 μ l 0,1 mol roztoku Sn(Oct)₂ v bezvodém toluenu. Násada byla dosušena 90 minut pod vakuem a ampule byla zatavena. Polymerizace probíhala při teplotě 110 °C 60 hodin. Vzniklý polymer byl rozpuštěn v dichlormetanu a izolován srážením do metanolu. Po filtraci byl polymer sušen ve vakuu při 40 °C. Tímto byl získán vysokomolekulární PLLA o střední molekulové hmotnosti 360 000 (stanoveno pomocí objemově vylučovací chromatografie v tetrahydrofuranu). PDLLA byl připraven polymerizací D,L-laktidu analogickým postupem a jeho střední molekulová hmotnost byla 630 000.

Pro pohodlnou manipulaci byla jako podkladový materiál pro ploché nosiče vybrána krycí kulatá sklíčka o průměru 12 nebo 30mm. Povrch kulatých krycích sklíček musel být modifikován směsí dimetyl-diethoxysilan/3-aminopropyl-triethoxysilanu. Tato hydrofobizace zlepšila adhezi PLLA a PDLLA materiálu ke skleněné podložce. Výroba probíhala rotačním nanášením vysokomolekulárního homopolymeru 0,5 % roztoku PLLA či PDLLA v chloroformu na PMW32 - Precision Photo Resist Spinner (Headway Research Inc., USA). Výška této vrstvy byla 50 nm. Při této příležitosti byly také připraveny pro testování povrchy, které vykazují minimální adsorpci proteinů. Minimalizovaná adsorpce proteinů z kultivačního média brání adhezi a následnému růstu buněk. Jako podklad pro tyto povrchy byla použita krycí sklíčka s PLLA filmem vyrobená podle výše uvedeného postupu. Modifikace byla založena na α -metoxy- ω -hydroxy poly(etylenoxidu) (mPEO). MPEO byl připraven řízenou polymerizací etylén oxidu. Na krycí sklíčko s PLLA byla sorpcí z 0,5 % roztoku vytvořena vrstva kopolymeru mPEO/PDLLA. Rozpouštědlem byla voda/dioxan (6/4). Sklíčko bylo inkubováno 2 minuty. Přebytek roztoku byl následně odstraněn. Nosiče byly sušeny ve vakuu 2 hodiny při teplotě 80°C . Následovalo další sušení při laboratorní teplotě 10 hodin. Kopolymerní povrchy byly vyráběny ve 2 variantách různých poměrů molekulových hmotností složek. Varianty 23000/10000 a 6000/5000 mPEO/PDLLA.

3.11.1.1 Adherence

Pro stanovení adherence byla použita krycí sklíčka o průměru 12mm. Sklíčka s povrchy byla svícena UV lampou 30 minut v laminárním boxu, sterilně

přenesena do 24 jamkových destiček. Do jamek bylo přidáno kultivační médium a destičky uloženy do inkubátoru při teplotě 37°C na 3 hodiny. Poté bylo kultivační médium vyměněno a MSC z primární expanze byly nasazeny v koncentraci 10^4 MSC/cm² na povrchy plochých nosičů. Povrchy PLLA, PDLLA, 23000/10000mPEO/PDLLA, 6000/5000mPEO/PDLLA, krycí sklíčko bez nosiče a samotný plast. Primárně byly MSC na nosičích kultivovány 3 hodiny v inkubátoru při teplotě 37°C. Vzorky po 3 hodinové kultivaci byly pod mikroskopem zkontrolovány a byla provedena fotodokumentace reprezentativních částí jednotlivých povrchů. Z fotodokumentace byly následně počítány MSC, které již adherovaly k povrchu. Vzorky byly dále v kultivačních destičkách inkubovány k diferenciačním pokusům.

3.11.1.2 Diferenciace MSC na 2D površích

MSC z obou způsobů výroby byly nasazeny na ploché nosiče tedy PLLA, PDLLA, 23000/10000mPEO/PDLLA, 6000/5000mPEO/PDLLA, krycí sklíčko bez nosiče a samotný plast. Diferenciace probíhala 4 týdny a kontrolní vzorky byly pěstovány ve standardním médiu pro MSC na obou velikostech krycích sklíček. Kultivace probíhala 4 týdny.

3.11.1.3 Adipogenní diferenciace

MSC byly nasazeny jak na 12mm krycí sklíčka a pěstovány ve 24 jamkových destičkách. MSC na těchto površích byly diferencovány střídavě indukčním a udržovacím adipogenním médiem. Kultivační media byla měněna každé 3 dny. Kultury na povrchu materiálů byly po 4 týdenní kultivaci barveny olejovou červení jak je uvedeno v kapitole 3.10.2 (str. 42). Byla provedena fotodokumentace.

3.11.1.4 Osteogenní diferenciace

K osteogenní diferenciaci byly MSC nasazeny v množství 10^4 MSC/cm² na materiály na krycích sklíčkách jak 12mm tak 30 mm v průměru. Diferenciace probíhala ve 24 jamkových respektive 6 jamkových kultivačních destičkách 4 týdny

v osteogenním médiu obsahující α MEM s 10% FBS, 10 mmol β -glycerol fosfát, 0,5 mmol fosfát kyseliny askorbové a 0,1 μ mol dexametazonu s ATB/ATM (PNC G, Streptomycin, Amfotericin B). Kultury z diferenciačních pokusů na 12mm sklíčcích byly barveny von Kossa barvením nebo barvením na alkalickou fosfatázu, jak je uvedeno v kapitole 3.10.1.1 (str. 41) a 3.10.1.2 (str.41). Preparáty byly následně vyhodnocovány a foceny na světelném mikroskopu. Kultury na površích 30mm sklíčček byly opláchnuty 10ml PBS. Dále byla sklíčka s povrchy a buněčnými kulturami na nich přenesena do čisté 6 jamkové destičky, kde byly adherentní buňky sklizeny 0.25% EDTA s 1% trypsinem a připraveny k průkazu osteokalcinu a ALP průtokovou cytometrií na FACSCalibur (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, Kalifornie, USA). Sklizené buňky byly resuspendovány v PBS s 2% FBS a za pomoci Intrastain kitu od firmy DakoCytomation (Dánsko) permeabilizovány. Protilátky Anti-osteokalcin PE (clone 190125) a anti-ALP (clone B4-78 - biotinylovaná) byly zakoupeny od R&D Systems (Minneapolis, USA). Anti-ALP byla detekována pomocí streptavidin-FITC od firmy R&D Systems (Minneapolis, USA). Jako kontroly byly použity Isotypové imunoglobuliny IgG1 FITC, IgG1 PE, od DakoCytomation (Dánsko). Za pozitivní na daný antigen byly pokládány buňky, jejichž značení mělo fluorescenci větší než 0,5% kontroly.

3.11.2 3D PLLA/PDLLA nosiče

Konstrukce trojrozměrného nosiče byla vláknitá s kontinuálními póry. Podstatu nosiče tvořila vlákna vysokomolekulárního PLLA dle již dříve publikovaného postupu (Kubies et al. 2000), která byla spojena a potažena PDLLA .

Pro dosažení vysoké molekulové hmotnosti byl nejprve připraven monomer (L-laktid) o vysoké čistotě. K výrobě samotných vláken byl syntetizován Polymerizací štěpením kruhu L-laktidu (L-LA) v tavenině při teplotě 110 °C s použitím katalyzátoru stannum-bis(2-ethylhexanoát) byl připraven vysokomolekulární PLLA. Střední molekulová hmotnost PLLA k výrobě vláken byla 360 000.

Polylaktidová vlákna byla připravena zvlákněním PLLA z roztoku. Zvláknění bylo dosaženo vytlačováním roztoku PLLA v dichlormetanu konstantní rychlostí kovovou tryskou o kruhovém průřezu a průměru v rozmezí 0,6 – 1,5 mm do koagulační lázně s metanolem za teploty 25°C. Použitím roztoku dichlormetanu s různou koncentrací PLLA (v rozmezí 2 – 12 %) bylo možné získat vlákna o

průměru v rozmezí 30 – 320 μm . Vlákna byla promyta metanolem a sušena při laboratorní teplotě 25°C.

Lisováním vláken PLLA ve formě, která určovala i výsledný tvar a geometrické parametry nosiče byly vyrobeny trojrozměrné porézní polymerní nosiče. Zafixování tvaru a objemu porézní struktury bylo dosaženo částečným slinutím vláken naleptáním jejich povrchu v parách rozpouštědla a zároveň slepením vláken v místech jejich dotyku roztokem PDLLA). Střední molekulová hmotnost PDLLA použitého k potažení vláken PLLA byla 630 000.

PLLA byl použit pro přípravu vláken pro svoje výhodné mechanické vlastnosti a omezenou rozpustnost v rozpouštědlech jako je aceton či toluen. Tato rezistence umožnila potažení vnitřních povrchů porézní struktury z PLLA vláken tenkou vrstvou PDLLA použitím roztoku PDLLA v acetonu, aniž by došlo k zhroucení porézní struktury PLLA vláken. Povlak PDLLA na povrchu vláken zpevňuje 3D strukturu a vytváří můstky mezi jednotlivými vlákny v místě jejich překřížení.

Vláknitá struktura umožňuje vytvořit kontinuální vnitřní povrch potřebný pro migraci MSC buněk v nosiči a *in vivo* mimo jiné také vrůstání cévního zásobení. Objem pórů v matrici bylo možné řídit hustotou vláken a mírou jejich komprese. Dalším parametrem určujícím velikost pórů je průměr samotných vláken. Nosiče byly vyráběny tak, aby vzdálenost mezi vlákny byla 100-400 μm , čímž se vlastnosti PLLA/PDLLA vláknitého nosiče podobaly struktuře spongiózní kosti.

3.11.2.1 Kultivace a osteogenní diferenciaci MSC na trojrozměrném PLLA/PDLLA nosiči

Nosiče byly před osazením buňkami byly sterilizovány po dobu 30 minut pod UV lampou a poté promyty kultivačním médiem a na 3h uloženy do inkubátoru při standardních podmínkách (CO₂ 5%, teplotě 37°C). Před nasazením buněk bylo medium vyměněno, aby byly odstraněny případné zbytky rozpouštědel. Na nosiče bylo nasazeno 1×10^5 MSC kultivovaných standardním postupem (s fetálním telecím sérem) nebo způsobem pro klinické užití. Nasazení probíhalo v úzkých komůrkách ve 2 dávkách, každá obsahovala $0,5 \times 10^5$ MSC s 3 hodinovým odstupem k umožnění nasednutí MSC na povrch nosiče. Nasazování probíhalo v komůrkách FALCON HTS FluoroBlok™ Insert (Scientific Laboratory Supplies Ltd., Velká Británie) s 3 μm filtrační membránou, pro MSC neprůchodnou, ale

umožňující difuzi media. Komůrky velmi přesně kopírovaly vnější průměr nosiče a jejich dno bylo opatřeno membránou. Nosiče byly jen těsně ponořeny, tak aby se zvýšila pravděpodobnost nasednutí MSC na vlákna nosiče. Před nasazením 2. dávky byl nosič sterilním nástrojem – injekční jehlou otočen. Po 24 hodinách byly nosiče sterilně přeneseny do 24 jamkové kultivační destičky. Kultivace probíhala v inkubátoru ve 37°C v médiu standardním i osteogenním s výměnou 2x týdně 4-6 týdnů. Před výměnou média byla provedena vizuální kontrola pod světelným inverzním mikroskopem Olympus a provedena fotodokumentace.

3.11.2.2 Barvení von Kossa

Barvení von Kossa bylo prováděno obdobně jako u kultur na tkáňovém plastu. Nosiče porostlé kulturami byly nejprve fixovány 15 minut 96 %, poté opláchnuty opakovaně vodou pro tkáňové kultury. Po odpipetování fixačního roztoku byl přidán 3% roztok dusičnanu stříbrného ve vodě pro tkáňové kultury. Inkubace probíhala na denním světle po dobu 30 minut. Následovalo důsledné opláchnutí vodou pro tkáňové kultury. Nanášení roztoků bylo prováděno opatrně pipetou do blízkosti nosiče, aby došlo k průniku reagensů do samotného nosiče a zároveň, aby se přebytečný dusičnan stříbrný vymyl z nitra nosiče. Ustálení reakce bylo provedeno 5% roztokem thiosíranu sodného ve vodě pro tkáňové kultury po dobu 2 minut s následným opatrným opláchnutím vodou, tak aby se buněčné struktury na povrchu nosiče nepoškodily.

3.11.2.3 Barvení na alkalickou fosfatázu

K průkazu alkalické fosfatázy na nosičích byl stejně jako u plochých kultur použit Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit od (Sigma-Aldrich). Nosiče tedy byly opláchnuty tris pufrem a fixovány 4% paraformaldehydem po dobu 30 minut, tak aby došlo k fixaci vnitřní části nosiče. Nosiče byly opatrně, ale řádně propláchnuty vodou pro tkáňové kultury. Nosiče s kulturami byly inkubovány 15 minut v čerstvě připraveném barvicím roztoku při pokojové teplotě a bez přístupu světla. Poté byl roztok odstraněn a vypláchnut z nosiče vodou pro tkáňové kultury. Některé nosiče byly dobarveny neutrální červení po dobu 1minuty. Roztok neutrální červeně bylo třeba opatrně vypláchnout z nosiče vodou pro tkáňové kultury. Preparáty byly vyhodnocovány mikroskopem a provedena fotodokumentace.

3.11.2.4 Elektronová mikroskopie a prvková analýza

Analýza elektronovou mikroskopií byla provedena na Jeol 6400 - scanning electron microscope v Ústavu makromolekulární chemie akademie věd České republiky v Praze (ÚMMCH). Nosiče pěstované ve standardním, osteogenním i mediu určenému pro klinické užití byly fixovány 4% paraformaldehydem. Poté byly vzorky sušené vzestupnou alkoholovou řadou etanol/voda a to v následujících poměrech: 25/75, 50/50, 50/50, 75/25, 75/25, 90/10, 90/10, 100/0, 100/0. V každém roztoku byl preparát ponechán 15 min. Potom byly preparáty sušeny pomocí kritického bodu CO₂. Po vysušení byly vzorky nařezány, nalepeny na terčík a pokoveny platinou. Prvková analýza byla provedena pomocí elektronové mikrosondy (EPMA) na rastrovacím elektronovém mikroskopu (Hitachi scanning electron microscope) na Fakultě chemické technologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze (VŠCHT).

3.11.2.5 Imunohistochemická barvení

Nosiče osazeného MSC ze standardní i kultivace pro klinické použití byly kultivovány 6 týdnů v osteogenním mediu. Po ukončení kultivace byly impregnovány pro nedostatek tkáně mezi vlákny a krájeny na tenké řezy. Řezy byly poté imunohistochemicky barveny na kolagen typu I, kostní sialoprotein a osteonektin. Imunohistochemická analýza byla provedena v Ústavu histologie a embryologie (Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové)

3.12 In-vivo implantace nosičů

Pokus na myším modelu byl v souladu s legislativou schválen ústavní komisí pro práci s laboratorními zvířaty. Na PLLA/PDLLA 3D nosiče byly nasazeny MSC v počtu 2×10^5 obdobným způsobem jak bylo popsáno v kapitole 3.11.2 (str.46). MSC pocházely z primární kultivace ve standardním mediu nebo z primární expanze v mediu pro klinické použití. Takto osazené nosiče byly nejprve kultivovány 3 týdny *in vitro* v osteogenním mediu a poté implantován imunodeficientní myši (NOD/LtSz⁻Rag1⁻). Implantace probíhala v laminárním boxu. Anestezie byla navozena intraperitoneální injekcí fenobarbitalu. Krátkým řezem v

oblasti pravých dolních žebber, za sterilních kautel byl nosič s buňkami pocházejícími z kultivace ke klinický účelům implantován podkožně a to proximálně od řezu. Analogicky z krátkého řezu druhostranně byl implantován nosič buď osazený buňkami pocházejícími z primoexpanze ve standardním mediu jako pozitivní kontrola nebo neosazený nosič jako kontrola negativní. Pokusná zvířata byla chována v nepatogenním prostředí, krmena sterilní stravou a acidifikovanou vodou s ATB (sulfamethoxazol-trimethoprim). Třetí a šestý týden po implantaci byly myši ve fenobarbitalové intraperitoneální anestezii podrobeny RTG vyšetření. RTG dokumentace byla pořízena na mamografu polikliniky VFN. Po 6-9 týdnech byla pokusná zvířata usmrcena a fixována perfuzí 10% formaldehydem. Nosiče a orgány myši byly poté podrobeny histologickému vyšetření. Histologické řezy byly barveny Ladewigovou modifikací Massonova modrého trichromu.

3.13 Statistická analýza

Kalkulace byly provedeny programem Statistica (StatSoft, Tulsa, OK). Normalita dat byla ověřena D'Agostino-Pearsonovým testem. Protože významné množství výsledků vykazovalo nenormální rozložení, užívali jsme neparametrické testy a výsledky byly vyjadřovány jako mediány a rozmezí. Párové vzorky byly srovnávány Wilcoxonovým testem; pro více interdependentních vzorků byla použita Friedmanova variace ANOVA s Dunnovými vícečetnými srovnáními. Pro dvě či více skupin nezávislých vzorků byly použity Mann-Whitneyův U-test a Kruskal-Wallisova ANOVA. Pro srovnání kategorických proměnných byly použity Yatesův korigovaný chí-kvadrát test nebo Fischerův přesný test. Hodnoty $p < 0.05$ byly považovány za statisticky významné.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Odběr MSC

Odběry kostní krve byly prováděny u pacientů indikovaných k trepanobiopsii v aseptickém prostředí. Nebyly zaznamenány vážné komplikace a nebyly pozorovány nežádoucí reakce. Ve všech případech se podařilo odebrat požadované množství pro laboratorní analýzu a zároveň 10ml pro experimentální účely. Vzhledem většímu objemu spongiózní kosti v oblasti *spina iliaca posterior superior* a vzhledem k variabilnímu průběhu *n. cutaneus femoris lateralis*, se kloníme k názoru, že pro garantování dostatečného množství odebraných MSC je výhodnější odběr z oblasti *spina iliaca posterior superior* než z oblasti *spina iliaca anterior superior*, stejně jako další autoři (Pierini et al. 2013). Pro odběr kostní krve za účelem výroby buněčného preparátu pro klinické účely je ovšem nutné, aby odběr byl uskutečněn na schváleném odběrovém místě na sále, za aseptických kautel do odběrového média. Dále, aby odběr probíhal do vhodných označených nádob či vaků, které umožní bezpečný transport a další zpracování v uzavřených či polouzavřených systémech v režimu certifikovaných čistých prostor.

4.2 Zpracování kostní krve

Zpracování kostní krve se stalo rutinním. Zpracováním 10ml kostní krve byl ve všech případech získán dostatek buněk k primární expanzi a produkci dostatku MSC pro celotělovou dávku. Většina autorů však používá ke kultivaci MSC pro klinické použití v ortopedii větší množství kostní krve 20-40ml (Kitoh et al. 2009, Zhao et al. 2012, Yamada et al. 2013). Vezmeme-li v úvahu učební křivku personálu při odběru a samotném zpracování kostní krve, tak pravděpodobně odběr 20ml kostní krve by byl vhodnější a měl by garantovat dostatečné množství MSC v aspirátu.

4.3 Media a suplementy

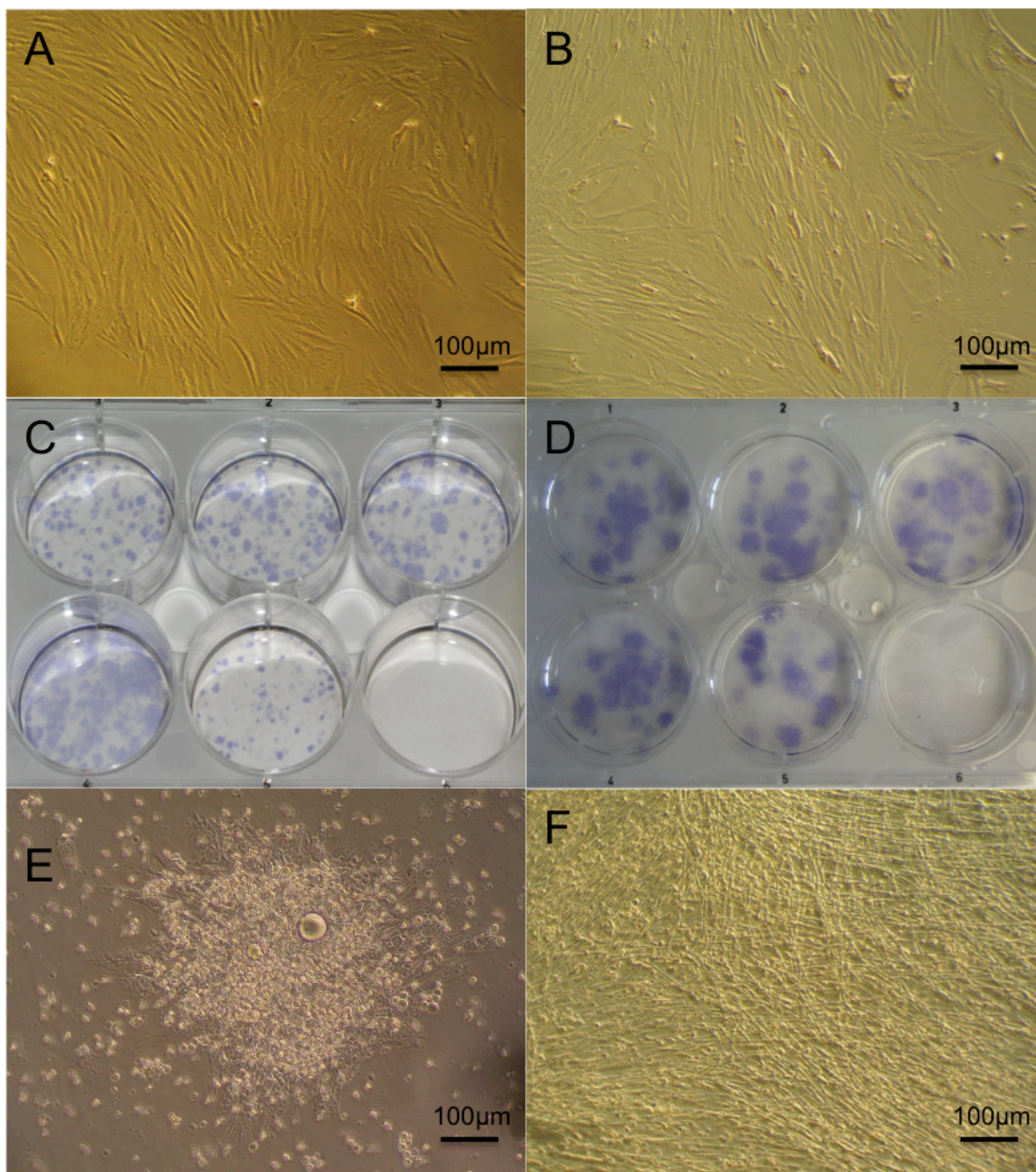
Media, roztoky, kultivační nádoby a další materiál používaný pro laboratorní účely byl při přípravě MSC pro klinické použití postupně úspěšně nahrazen. Při záměně za výrobky schválené pro klinické použití docházelo k nevýznamnému snížení množství vykultivovaných MSC. Po náhradě materiálu laboratorního za materiál ke klinickému použití nebyla pozorována statisticky významná změna kvality buněk. Růstové faktory byly používány v kvalitě pro laboratorní účely, protože v té době nebyly tyto faktory v klinické kvalitě dostupné nebo extrémně finančně nákladné. Pro další přenos metodiky bude nutné zaměnit tyto suplementy za certifikované výrobky pro klinické použití, nebo prokázat nezávadnost takovýchto suplementů k výrobě MSC pro klinické účely.

4.4 Standardní primární kultivace MSC

Pěstování MSC z mononukleární frakce buněk kostní krve (BMMC) se stal rutinní metodikou. Dodržování operačních postupů výroby eliminovalo riziko kontaminace při kultivaci. V případě konfluence byly MSC sklizeny dříve než za 6 týdnů a přesazeny. Buňky po 6 týdenní kultivaci jsou vhodné jako referenční vzorky nebo k provádění dalších pokusů. Buňky ze standardních kultivací nabývaly typické větvenovité vzezření MSC, což dokumentuje Obrázek 1A (str.53) kultur po 2 týdenní kultivaci. Takto získané MSC lze pasážovat i dlouhodobě.

4.5 Kokultivace MSC s alogenními monocyty periferní krve

Nejprve bylo v kultivačním médiu 10%FBS nahrazeno 10% alogenním lidským sérem (HS). MSC ze standardní primární expanze byly nasazeny na kultivační lahve do media na bázi α MEM s 10% HS. Kolonie byly velmi malé, stejně tak, jako jejich počet. Bylo zřejmé, že FBS obsahuje růstové faktory, které jsou pro expanzi MSC nepostradatelné.



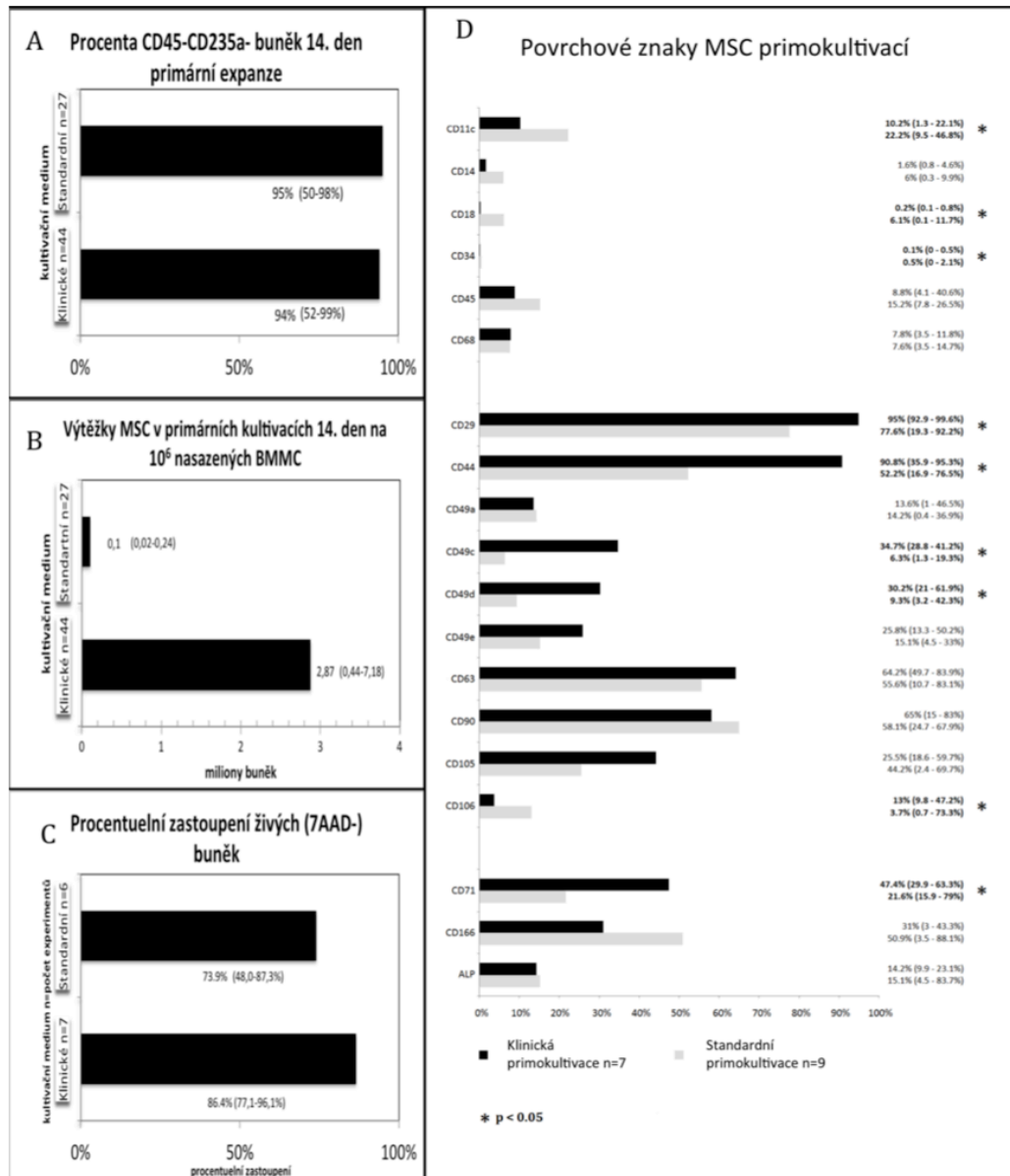
Obrázek 1: **A** Standardní primokultivace MSC 2 týdny, nativní snímek (Pytlík et al. 2009), **B** První pasáž MSC v médiu obsahujícím α MEM 10% HS v kokultivaci s alogenními monocytami, **C** Kolonie MSC pěstované 14 dní v médiu obsahujícím α MEM 10% HS v kokultivaci s alogenními monocytami v stoupajícím množství (50 tisíc 1.jamka, 200 tisíc 2.jamka, 500 tisíc 3. jamka, 1milion 4. jamka, 0 5. jamka – kontrola pozitivní (pouze MSC), 1milion 6. jamka – negativní kontrola (pouze mononukleární buňky periferní krve), se zvětšujícím se počtem monocytů se zvětšuje velikost kolonií, barvení krystalovou violetí, **D** Kolonie MSC pěstované 14 dní v médiu obsahujícím α MEM 10% HS v kokultivaci s alogenními monocytami v stoupajícím množství (50 tisíc 1.jamka, 200 tisíc 2.jamka, 500 tisíc 3. jamka, 1milion 4. jamka, 0 5. jamka – kontrola pozitivní (pouze MSC), 1milion 6. jamka – negativní kontrola (pouze mononukleární buňky periferní krve), se zvětšujícím se počtem monocytů nebyl pozorován vliv na velikost kolonií – (jiní dárce) barvení krystalovou violetí, **E** primokultivace MSC patentovaným postupem 7.den, nad středem MSC kolonie jsou patrné neadherentní buňky kostní dřeně, **F** primokultivace MSC patentovaným postupem 14.den, vrstevnatý charakter kolonií (Pytlík et al. 2009);

Poměrně snadno získatelným zdrojem růstových faktorů jsou adherentní monocyty, které jsou na rozdíl od trombocytů schopné dlouhodobé produkce růstových faktorů. Monocyty a následně makrofágy bylo možné na kultivačním povrchu a na povrchu kolonií pozorovat mikroskopem (Obrázek 1B, str. 53). Za přítomnosti monocytů allogenních dárců byly MSC schopny expanze. Na kulturách obarvených krystalovou violetí Na obrázku 1C (str. 53) je patrné, jak se zvětšujícím se počtem monocytů docházelo k zvětšování kolonií. Protože ale efekt nebyl uniformní (Obrázek 1D, str. 53), primární expanze v α MEM s 10%HS selhávala a při klinické aplikaci by bylo pravděpodobně třeba velkého množství autologních monocytů a alogenní kontaminace MSC preparátu by byla nežádoucí, bylo od dalších pokusů ustoupeno. Přesto z experimentu vyplynulo, že mononukleární frakce periferní krve je pravděpodobně schopna se pozitivně podílet na expanzi MSC, i když z koncepce tohoto primitivního experimentu nelze tento benefit kvantifikovat. To, že monocyty mohou kladně ovlivnit kultivaci MSC je jedním z argumentů, proč není nezbytně nutné, abychom neadherentní, nebo lehce přisedlé buňky z kostní krve v primární expanzi odstraňovali, ale naopak, že by se tyto buňky mohly pozitivně podílet na proliferaci MSC svou aktivitou. Podobný kokultivační systém pro diferenciaci endotelových buněk, též bez nutnosti dodávky růstových faktorů byl publikován Joensuu et. al. (Joensuu et al. 2011). Vzhledem k tomu, že pro klinické užití MSC je nutná garance dobrého výtěžku a kvality primoexpanze, se naše pozornost upřela k použití rekombinantních lidských růstových faktorů, jako suplementů do kultivačního media.

4.6 MSC kultivace ke klinickému použití

MSC potenciálně použitelné ke klinické aplikaci jsme pěstovali patentovaným postupem 14 dní. MSC kolonie rostly mnohem rychleji a nad jejich středem se pohybovaly neadherované buňky (Obrázek 1E, str. 53). Kolonie postupně nabývaly vrstevnatého charakteru (Obrázek 1F, str. 53). Po ukončení primární expanze byly neadherentní buňky odmyty. Jak je zřejmé z tabulky grafů č.1 (graf A, str. 55), po odmytí nebyla kontaminace bílou či červenou krevní řadou, tedy CD45+ a CD235a+, statisticky významně vyšší, než při primární expanzi MSC ve standardním mediu s odmytím neadherentní složky již na počátku kultivace. Část

buněčného produktu byla použita k další analýze a většina MSC byla použita na další experimenty.



Tabulka č. 1: Grafy: A: Procento dvojitě negativních buněk CD45- a CD235a- rozdíl mezi standardní metodikou a metodikou ke klinickým účelům nenabyl statistické nevýznamnosti ($p=0,10$). **B:** Výtěžky primokultivací MSC 14.den vztaženy na 10⁶ nasazených BMMC statisticky významný rozdíl mezi standardní metodikou a metodikou ke klinickým účelům ($p<0,0001$). **C:** Procento viabilních (7AAD-) buněk standardní metodikou a metodikou ke klinickým účelům nenabyl statistické nevýznamnosti ($p=0,51$). **D:** Srovnání povrchových znaků buněk pěstovaných standardní metodikou a metodikou ke klinickým účelům. * značí statistickou významnost rozdílů ($p<0,05$). (Pytlík et al. 2009)

Pro reálné klinické využití takto kultivovaných MSC je nutné verifikovat také sterilitu. Standardně toto nebylo v rámci prezentovaných experimentů prováděno.

4.7 Stanovení počtu MSC po primární expanzi

Do této části studie bylo zařazeno 44 pacientů. MSC od všech dárců byly expandovány metodikou ke klinickému použití a 27 z nich i standardním způsobem 14 dní. K stanovení množství MSC v buněčném produktu primoexpanze byla použita průtoková cytometrie. Při porovnávání FACS CD panelu pro simplifikaci jsme z adherentních buněk považovali za MSC buňky splňující negativitu pro bílou i červenou krevní řadu, tedy CD45- a CD235a-. K samotnému výpočtu MSC v buněčné populaci po primární expanzi byl použit vzorec tak, jak je uvedený v kapitole 3.7 (str. 38). Při výrobě MSC standardním způsobem byly dosahovány výtěžky s mediánem $1,0 \times 10^5$ ($0,02-0,24 \times 10^6$) na milión nasazených BMMC (Tabulka č. 1, graf B, str. 55). Z jedné 75cm^2 kultivační lahve po 14 dnech tedy bylo sklizeno vyjádřeno mediánem 0,75 miliónu MSC. Pokud jsme ve standardním mediu nechali kolonie kultivovat další 4 týdny, byly výtěžky desetinásobné tedy $7,5 \times 10^6$ z jedné 75cm^2 . Celotělovou i.v. dávkou MSC, za kterou je považováno přibližně 1×10^6 MSC/kg pacienta (Murphy et al. 2013) bylo možno vypěstovat při odběru 10ml kostní krve za 6 týdnů. Buňky expandované způsobem použitelným ke klinické aplikaci měly výtěžky mnohonásobně vyšší. Medián zisků byl $2,87 \times 10^6$ ($0,44-7,18 \times 10^6$) na milión nasazených BMMC (Tabulka č. 1, str. 55, graf B), tedy z jedné 75cm^2 kultivační lahve byl medián úhrnných zisků $21,8 \times 10^6$. Rozdíly ve výtěžcích byly statisticky významné ($p < 0,0001$). Touto metodou lze tedy spolehlivě celotělovou dávkou MSC z 10 ml kostní krve napěstovat již za 2 týdny. Dosažené výtěžky poukazují na potenciální možnost kultivace MSC z kostní dřeně metodikou pro klinické použití po dobu ještě kratší než 14 dní.

4.8 Antigenní analýza buněk primární expanze

Standardně primoexpandované buňky splňovaly minimální antigenní kritéria definice MSC stanovená Mezinárodní společností pro buněčnou terapii (Dominici

et al. 2006), tedy CD105+, CD73+, CD90+, CD45-, CD34-, CD14-, CD19-, HLA-DR-. Pro další použití MSC je významné určit, jaká část buněk je životaschopná. Proto byl buněčný produkt značen 7-AAD, buňky které se neznačily, byly považovány za živé. Medián procentuálního zastoupení živých buněk získaných standardní kultivací byl 73.9% (Tabulka č. 1, graf C, str. 55). Testovány byly i další významné buněčné antigeny patřící adhezivním molekulám a receptorům (Tabulka č. 1, graf D, str. 55).

Buňky kultivované metodikou pro klinické použití stejně jako standardně pěstované kultury se vyznačovaly obdobnou pozitivitou markerů MSC a též splnily minimální kritéria MSC (Tabulka č. 1, graf D, str. 55). Tyto buňky statisticky významně více exprimovaly CD44, tedy receptor vážící kyselinu hyaluronovou, kolagen I, fibronektin a další součásti extracelulární matrix. Statisticky významně více tyto MSC exprimovaly i CD29 (β 1-integrin), CD 49c, CD49d (α 3 a α 4 integrin) patřící mezi adhezivní molekuly (Tabulka č. 1, graf D, str. 55). Nezanedbatelná byla vysoká 7-AAD negativita, která svědčila o vyšší viabilitě buněk, ale ve srovnání se standardně pěstovanými buňkami tento rozdíl nenabyl statistické významnosti ($p < 0,5$) (Tabulka č. 1, graf C, str. 55).

4.9 Stanovení BMP 2, BMP 7 a osteokalcinu

V tomto experimentu bylo testováno 6 různých primokultivací MSC a to ve standardním a v médiu určeném ke klinickému použití. Osteokalcin je jedním ze znaků postproliferčních osteoblastů, proto byla BMP 2 a BMP7 pozitivita posuzována samostatně v osteokalcin negativní a pozitivní frakci (Tabulka č. 2, str. 58). U MSC pěstovaných standardním způsobem byla pozorována ve frakci osteokalcin negativních buněk pozitivita BMP 2 v $7,5 \pm 8,0\%$ a BMP 7 v $9,0 \pm 8,7\%$ buněk. U buněk ke klinickému použití statisticky významně vyšší pozitivita pro BMP 2 a to $28,7 \pm 6,3\%$ ($p < 0,01$). Pozitivita buněk pro BMP 7 byla velmi variabilní a byla pozorována u $4,3 \pm 5,4\%$, kde rozdíl vůči standardnímu pěstování nenabyl statistického významu. Ve frakci osteokalcin pozitivních buněk byla u standardního média pozitivita BMP 2 v $3,6 \pm 1,5\%$ a BMP 7 v $6,3 \pm 4,1\%$ buněk. V médiu určenému ke klinickému použití byla změřena pozitivita BMP 2 v $22,6 \pm$

18,9% a BMP 7 v $6,2 \pm 7,7\%$ buněk. Rozdíly v osteokalcin pozitivní frakci, i když pro BMP 2 hraničně ($p=0,06$), nenabyl statistické významnosti. BMP 2 působí jako chemoatraktant MSC a hraje zásadní roli v proliferaci a diferenciaci MSC (Tsuji et al. 2006, Yu et al. 2010).

: Srovnání exprese BMP 2 a BMP 7 u MSC kultivovaných ve standardním médiu a médiu ke klinickému použití. Srovnání provedeno párovým T-testem (Stehlik et al. 2012)

% pozitivních buněk (medián± standardní odchylka)		Statistická významnost
Osteokalcin negativní frakce		
BMP 2 pozitivní		
Standardní médium	7.5 ± 8.0%	p = 0.0039
Klinické médium	28.7 ± 6.3%	
BMP 7 pozitivní		
Standardní médium	9.0 ± 8.7%	p = 0.37
Klinické médium	4.3 ± 5.4%	
Osteokalcin pozitivní frakce		
BMP 2 pozitivní		
Standardní médium	3.6 ± 1.5%	p = 0.055
Klinické médium	22.6 ± 18.9%	
BMP 7 pozitivní		
Standardní médium	6.3 ± 4.1%	p = 0.97
Klinické médium	6.2 ± 7.7%	

Je pravděpodobné, že určité subpopulace MSC expandovaných způsobem ke klinickému použití se diferencovaly ve směru chondrogenní či osteoblastové linie. Na druhou stranu si podstatná část buněk v expanzi ke klinickému použití zachovala mitotickou aktivitu, buněčný produkt nese znaky MSC a jak bude ukázáno dále mají buňky zachovanou schopnost diferenciaci. Pozitivita BMP 7 byla u obou kultivačních postupů velmi podobná. Určité hladiny buněk pozitivně značícími se na BMP 2 a BMP7 v MSC kulturách byly detekovány i jinými týmy (Lv, Liu et al. 2014). Testování buněčného preparátu také na pozitivitu BMP 2 a

osteokalcin by mohlo být používáno pro kontrolu kvality buněčného produktu MSC kultivací určených pro klinické použití, ale i pro porovnání různých kultivačních protokolů. K potvrzení této domněnky a stanovení regulí pro posuzování kvality je třeba dalších experimentů. Stejně tak zůstává otázkou, jestli a u jakého množství buněk pozitivních na BMP dochází k transportu BMP do media či extracelulární matrix.

4.10 Průkaz diferenciační schopnosti primokultivací MSC

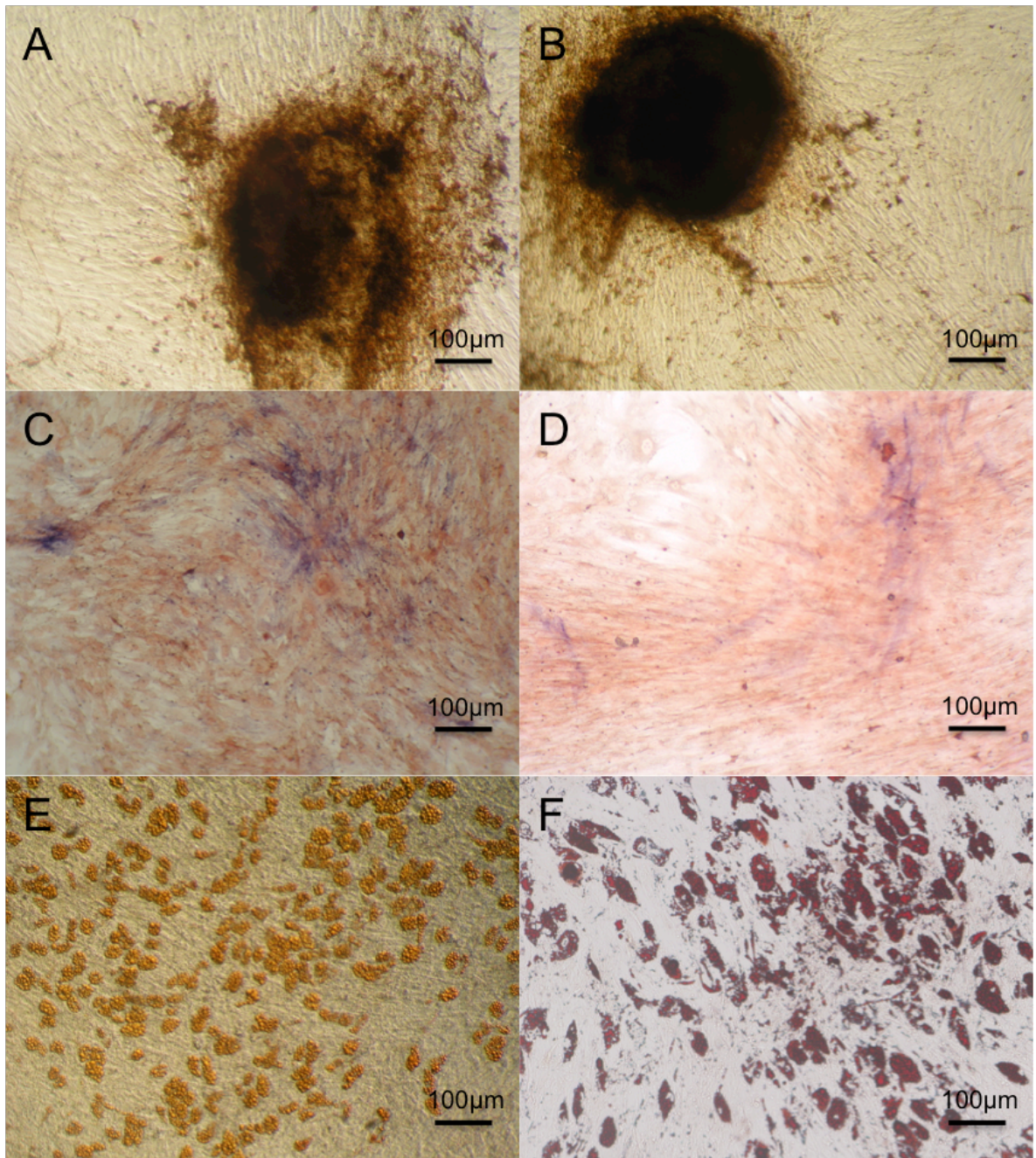
K průkazu diferenciačních schopností MSC z primokultivací standardní metodikou a způsobem určeným ke klinickému použití byly použity buňky 6 dárců. MSC byly kultivovány duplicitně v diferenciačních médiích do osteogenní, chondrogenní a adipogenní linie

4.10.1 Osteogenní diferenciace MSC

MSC z primárních standardních a klinických expanzí po 4 týdenní kultivaci v osteogenním médiu byly barveny von Kossa barvením a barvením na alkalickou fosfatázu.

4.10.1.1 Barvení von Kossa

Ve von Kossa barvení byla pozorována černá depozita odpovídající hydroxyapatitu v extracelulární matrix. Buňky vypěstované oběma způsoby většinou po 2 týdnech kultivace začaly vytvářet kostní uzlíky pozorovatelné i na živých kulturách v mikroskopu. Po barvení von Kossa se tyto kostní uzlíky, kde depozit bylo nejvíce barvily černě (Obrázek 2A a 2B, str. 60). Barvení von Kossa není specifické pro hydroxyapatit, proto k ověření musela být použita prvková analýza (viz kapitola 4.11.2.1, str. 65).



Obrázek 2: Osteogenní a adipogenní diferenciacie primokultivací MSC. A: osteogenní diferenciacie, standardně primokultivované MSC, barvení von Kossa (pozitivní deposita se barví černě), kostní uzel. B: osteogenní diferenciacie, MSC primokultivované metodikou pro klinické účely, barvení von Kossa (pozitivní deposita se barví černě), kostní uzel. C: osteogenní diferenciacie, standardně primokultivované MSC, barvení na alkalickou fosfatázu (pozitivní buňky se barví modře), dobarveno neutrální červení. D: osteogenní diferenciacie, MSC primokultivované metodikou pro klinické účely, barvení na alkalickou fosfatázu (pozitivní buňky se barví modře), dobarveno neutrální červení. E: adipogenní diferenciacie, standardně primokultivované MSC, barvení olejovou červení (pozitivní buňky se barví červeně). F: adipogenní diferenciacie, MSC primokultivované metodikou pro klinické účely, barvení olejovou červení (pozitivní buňky se barví červeně).

4.10.1.2 Barvení na alkalickou fosfatázu

Buňky získané standardní metodikou (Obrázek 2C, str. 60) i metodou ke klinickým účelům (Obrázek 2D, str. 60) se po 2 týdnech diferenciaci v osteogenním mediu barvily pozitivně na alkalickou fosfatázu. Modré barvivo lemovalo buněčné membrány. Pozitivita alkalické fosfatázy v průběhu diferenciaci stoupá až do stádia osteoblastů.

4.10.2 Adipogenní diferenciaci

Buňky jak ze standardní primokultivace, tak i z kultivace ke klinickým účelům začaly po 2. týdnu vytvářet kulaté útvary v cytoplazmě patrně v inverzním mikroskopu. Množství buněk s těmito formacemi postupně přibývalo. Po dokončení diferenciaci se tyto měchýřkovité struktury barvily pozitivně olejovou červení. Tímto byla prokázána přítomnost tukových kapének a schopnost buněk vypěstovaných oběma způsoby se diferencovat v adipocyty (Obrázek 2E a 2F, str. 60).

4.10.3 Chondrogenní diferenciaci

Při chondrogenní diferenciaci buňky pěstované oběma metodami vytvářely mikromasy a získaly fenotyp podobný chondrocytům. Buňky získané CLI kultivací však vytvářely mikromasy pouze tehdy, bylo-li použito v diferenciaci rovněž CellGro™ médium s FGF-2, PDGF-BB, EGF a TGF- β 1. Ve všech získaných mikromasách se vytvořená extracelulární matrix barvila pozitivně alciánovou modří a protilátkami proti kolagenu typu II (Obrázek 5B, str. 69).

Výsledný buněčný produkt z obou způsobů kultivace svojí schopností diferenciaci do osteogenní, adipogenní a chondrogenní linie splnil diferenciaci kritéria ISCT pro MSC.

Výroba MSC musí splňovat všechny nároky místně příslušných regulačních orgánů (FDA, EMA, SÚKL) na výsledný buněčný produkt, tedy: identitu, čistotu, potenci, efektivitu, sterilitu a zejména bezpečnost. Tedy dalším logickým krokem převedení výše popsané metodiky určené ke klinickým účelům do certifikovaných čistých výrobních prostor a následně registrace klinické studie. Bylo publikováno nespočet způsobů kultivace MSC potenciálně ke klinickým účelům, ale jen

nepoměrně menší množství je testováno v klinických studiích. V současné době je registrováno několik set klinických studií s aplikací kultivovaných MSC (www.clinicaltrialregistar.eu, www.who.int/ictrp, www.clinicaltrials.gov). Výsledky s aplikací pro regeneraci kostní tkáně jsou publikovány v současné době pouze sporadicky (Liebergall et al. 2013). U všech ostatních studií zveřejnění výsledků chybí. Z dalších skeletálních aplikací MSC bylo v nedávné době publikováno několik způsobů kultivace MSC ke klinickému použití k léčbě gonartrózy, které prošly úspěšně fází I klinické studie, tedy bezpečností (Otsuru et al. 2012, Jo et al. 2014, Orozco et al. 2014, Vega et al. 2015). Ovšem aby jakákoli buněčná terapie spadající do kategorie pokročilých terapií (ATMP) mohla být rutinně použita, je nutno ověřit její bezpečnost a účinnost v klinických studiích až po fázi III. Tedy spolehlivý zdroj velkého množství MSC pro terapeutické účely je stále nedořešeným problémem, který brání širokému použití dospělých kmenových buněk v klinické praxi.

Naším kolektivem popsaný originální postup kultivace MSC bez zvířecích bílkovin, bez nutnosti odmytí neadherentních buněk a bez nutnosti výměny média umožňuje rychlou kultivace v průběhu dvou týdnů. Kokultivace adherentní a neadherentní složky mononukleárních buněk z kostní krve se zdá být pro pěstování MSC prospěšná (Baksh et al. 2005). Nejenže společná kultivace neadherentní buněk stimuluje MSC k růstu, ale také odpadá jeden kritický krok, tedy nutnost separace neadherentních buněk. Navíc takto pěstované kokultury nevyžadují výměnu média po dobu 2 týdnů. Tímto je výrobní proces jednodušší, množství kritických kroků radikálně nižší, snižuje se riziko kontaminace a proces je možno přenést do prakticky uzavřeného systému. Hlavní výhodou tohoto kultivačního postupu je jeho rychlost. Z dobrých výtěžků po 14 dnech kultivace lze odhadovat, že tato metodika má potenciál dobu kultivace ještě zkrátit. Rychlosti kultivačního postupu bylo pravděpodobně dosaženo třemi faktory: užitím lidského séra místo fetálního telecího séra, dále užitím růstových faktorů a cytokínů a konečně kultivací MSC společně s neadherentními krvetvornými buňkami. Takto dosažená krátká doba kultivace by v klinické praxi mohla výrazně zlepšit a rozšířit možnosti buněčné terapie a tkáňového inženýrství muskuloskeletálního systému nejen u plánovaných výkonů, ale také při léčbě traumat.

Dalším logickým krokem je převedení výše popsané metodiky určené ke klinickým účelům do certifikovaných čistých výrobních prostor a následně registrace klinické studie.

4.11 PLLA/PDLLA

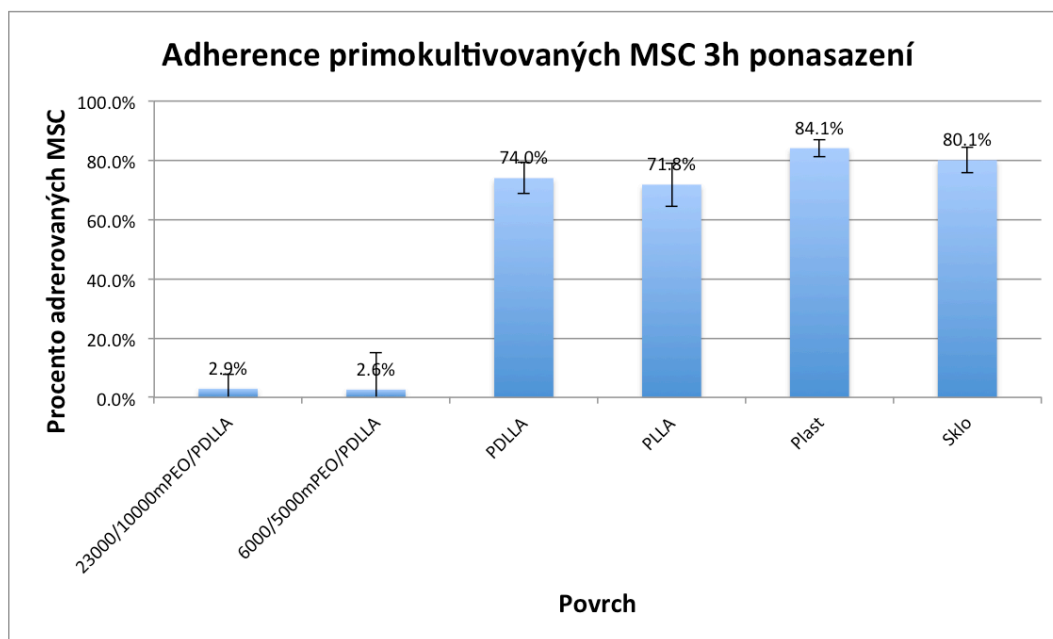
Pro první testování, zda nosiče na bázi polylaktidů jsou schopny umožnit navázání, diferenciaci a dlouhodobé přežívání MSC byly vytvořeny ploché 2D nosiče, kde byla testována adherence a poté schopnost diferenciaci. Takto připravené povrchy simulovaly povrch základního polyesterového nosiče a sloužily jako referenční povrchy při vyhodnocování vlivu struktury a chemického složení povrchu na interakci polymeru s buňkami. Na tuto fázi navázalo in vitro testování 3D nosiče. Na závěr bylo přistoupeno k in vivo testování osídleného nosiče na imunodeficientním myším modelu.

4.11.1 Adherence, kultivace a diferenciaci na 2D PLLA/PDLLA nosičích

K posouzení adherence MSC na různé povrchy byly použity buňky 4 dárců v duplexu. Po 3h kultivaci byla na základě fotodokumentace vyhodnocena adherence MSC. Jako prokazatelně adherované buňky byly považované ty, které ztratily sférickou formu a vytvořily rozeznatelný lem cytoplazmy v okolí jádra. Z testovaných povrchů PLLA, PDLLA, 23000/10000mPEO/PDLLA, 6000/5000mPEO/PDLLA, krycí sklíčko bez nosiče a samotný plast, byla adherence nejnižší u PEO kopolymerů (Graf č. 1, str. 64). V adherenci MSC na 2 PEO kopolymery nebyl statisticky významný rozdíl. Nejvyšší adherence MSC byla na samotný plast, ale mezi ním a povrchy PLLA a PDLLA nebyl statisticky významný rozdíl.

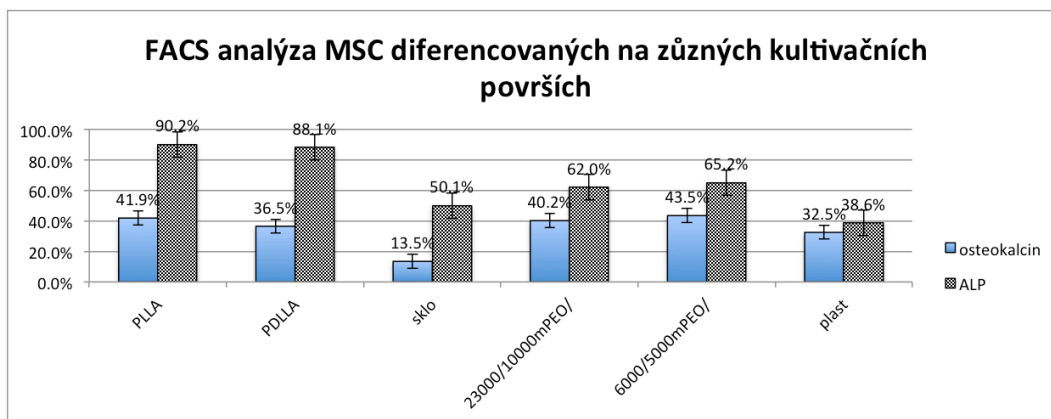
Výsledky adherencí ukázaly, že MSC jsou schopny navázání na povrch PLLA a PDLLA a pravděpodobně umožní další proliferaci a diferenciaci MSC. PEO kopolymery s takto nízkou adherencí by bylo možno použít jako základní strukturu k výrobě nosiče, který by na svém povrchu nesl epitopy k selektivní adhezi buněk.

Nicméně MSC byly schopny na PEO povřích se po navázání a pravděpodobně další adsorpci proteinů na povrch PEO množit i diferencovat.



Graf č. 1 Adherence MSC z primokultur na různé povrchy po 3 hodinách: kopolymery 23000/10000mPEO/PDLLA a 6000/5000mPEO/PDLLA, dále PLLA, PDLLA, plast a sklo.

MSC z primární expanze po 4 týdenní kultivaci v adipogenním médiu diferencovaly na všech materiálech do buněk, které obsahovaly vakuoly barvící se olejovou červení a morfologicky nabývaly vzhled adipocytů (Obrázek 5C, str. 69). V osteogenním médiu se také na všech povřích buňky pozitivně barvily na ALP a vytvářely depozita, která se barvila černě v barvení von Kossa. Na PLLA a PDLLA se formovalo více depozit než na ostatních povřích. Naopak nejméně depozit bylo pozorováno na skle. Větší sklíčka byla sklizena a testována FACS na přítomnost ALP a osteokalcinu. Nejvíce buněk pozitivních bylo pozorováno na PLLA a PDLLA povřích, nejméně na skle (Graf č. 2, str. 65). Z výsledků zejména pozitivivity osteokalcinu je patrné, že diferenciaci MSC na PLLA a PDLLA do osteogenní linie je více pokročilá tak, jak bylo zřejmé z barvení von Kossa. MSC byly schopny na 2D nosičích kultivace i diferenciaci do osteogenní (Obrázek 5A, str. 69) i adipogenní linie (Obrázek 5C, str. 69).



Graf č. 2 FACS analýza (osteokalcin a ALP) buněk diferencovaných z MSC primokultivací v osteogenním médiu na různých površích: PLLA, PDLLA, sklo, kopolymery 23000/10000mPEO/PDLLA a 6000/5000mPEO/PDLLA a plast.

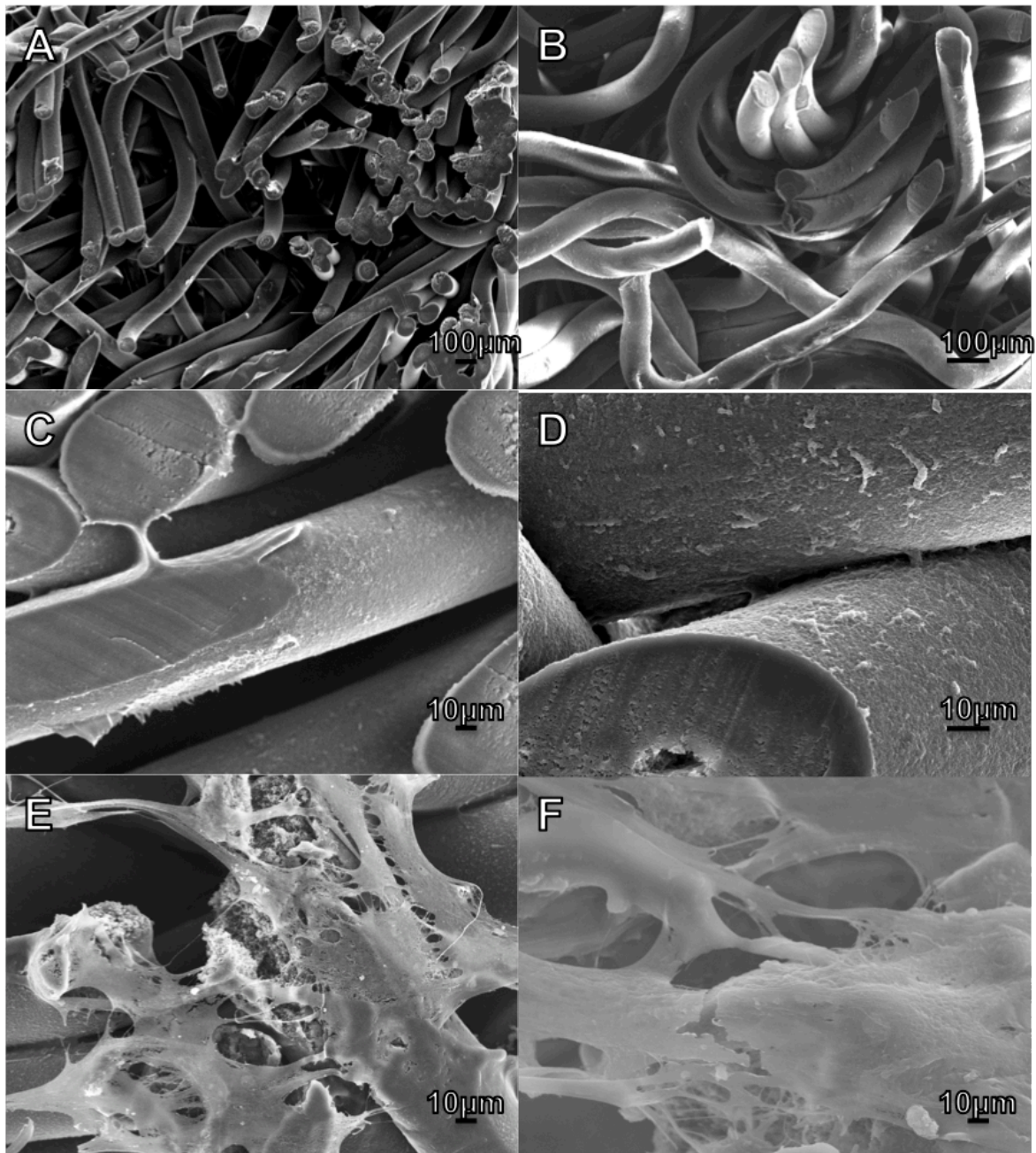
4.11.2 3D PLLA/PDLLA nosiče

Vyrobený vláknitý PLLA/PDLLA měl porozitu $70\% \pm 4\%$ a medián průměru vláken byl $70 \mu\text{m}$ (Obrázek 3A a 3B, str. 66). Pelety nosiče měly průměr 5mm a tloušťku 1,5mm. Vlákná PLLA konstantní velikosti byla pokryta kontinuální hladkou vrstvou PDLLA (Obrázek 3, str. 66). Vlákná navzájem byla spojena můstky PDLLA, jak je patrné z obrázku z elektronového mikroskopu (Obrázek 3C, str. 66) Takto spojené prostory se zdály vhodné nejen pro migraci a diferenciaci buněk, ale i jak se předpokládalo i pro vrůst cév (viz kapitola 4.11.2.2, str. 68). Nejprve proběhly kultivační a diferenciační pokusy a poté následovalo použití nosiče *in vivo*. Podařilo se vyrobit stabilní nosič s porozitou podobnou spongiózní kosti s prostory $100\text{--}400 \mu\text{m}$. Tento nosič umožnil snadnou manipulaci při diferenciačních pokusech i při implantaci *in vivo*.

4.11.2.1 Kultivace a diferenciaci na 3D PLLA/PDLLA

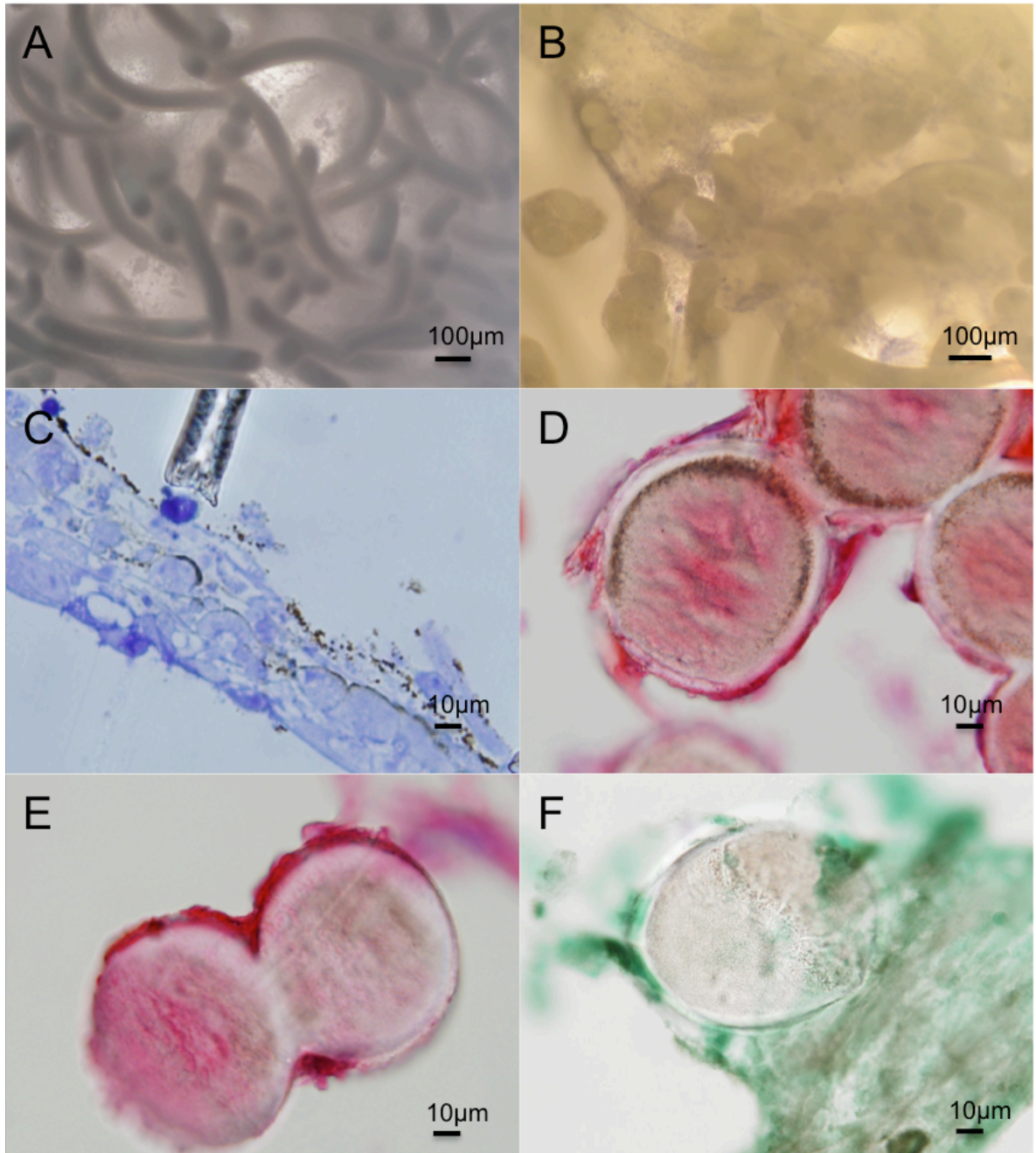
Při nasazování MSC na nosič buňky adherovaly zejména v oblasti křížení vláken. Část buněk propadla skeletem nosiče až na dno komůrky, bez toho, že by se na nosič navázala. Buňky zachycené v konstrukci byly schopny celý nosič kolonizovat. Postupně prostory mezi polyaktidovými vlákny buňky přemostovaly. Populace buněk využívaly zejména povrchové části nosiče (Obrázek 3E, str. 66). Směrem do středu nosiče buněk ubývalo, ale jejich přítomnost byla zřetelná. V elektronovém mikroskopu bylo patrné, že buňky ve standardním médiu se

množí, vyplňují prostory mezi vlákny a produkují extracelulární matrix i ve střední části nosiče (Obrázek 3F, str. 66).



Obrázek 3: Skenovací elektronová makroskopie 3D PLLA/PDLLA nosiče. A: nosič bez buněk, B: nosič bez buněk detail kontinuálních prostor mezi vlákny, C: křížení vláken a můstek mezi vlákny vytvořený PDLLA, nosič bez buněk, D: detail PLLA vlákna s kontinuální vrstvou PDLLA na povrchu, nosič bez buněk, E: Povrch nosiče osazeného MSC 14.den kultivace *in vitro* ve standardním médiu, patrný výběžky navzájem propojené MSC, F: Středová část nosiče osazeného MSC 14.den kultivace *in vitro* ve standardním médiu, patrný MSC přemostující prostory mezi vlákny nosiče

V osteogenním médiu byla ve světelném mikroskopu zřetelná depozita, kterých s postupem času depozit přibývalo (Obrázek 4A, str. 67). Tato depozita se barvením von Kossa barvila černě (Obrázek 4C, str. 67).



Obrázek 4: Osteogenní diferenciaci klinicky expandovaných MSC na 3D PLLA/PDLLA nosiči *in vitro* 4 týdny; A nativní snímek z inverzního mikroskopu mezi vlákny nosiče jsou patrná depozita hydroxyapatitu, B barvení na alkalickou fosfatázu (pozitivní buňky se barví modře), C barvení von Kossa a toluidinová modř – černá deposita odpovídají hydroxyapatitu, D imunohistochemické barvení - kolagen I (červeně), E imunohistochemické barvení kostní – sialoprotein (červeně), F imunohistochemické barvení – osteonektin (zeleně).

Buňky se barvily pozitivně v barvení na alkalickou fosfatázu, tedy modře (Obrázek 4B, str. 67 a Obrázek 5D, str. 69). Imunohistochemická barvení, nosičů osazených MSC a kultivovaných 4 týdny v osteogenním médiu, byla pozitivní na kolagen typu I (Obrázek 4D, str. 67), kostní sialoprotein (Obrázek 4E, str. 67) i osteonektin (Obrázek 4F, str. 67).

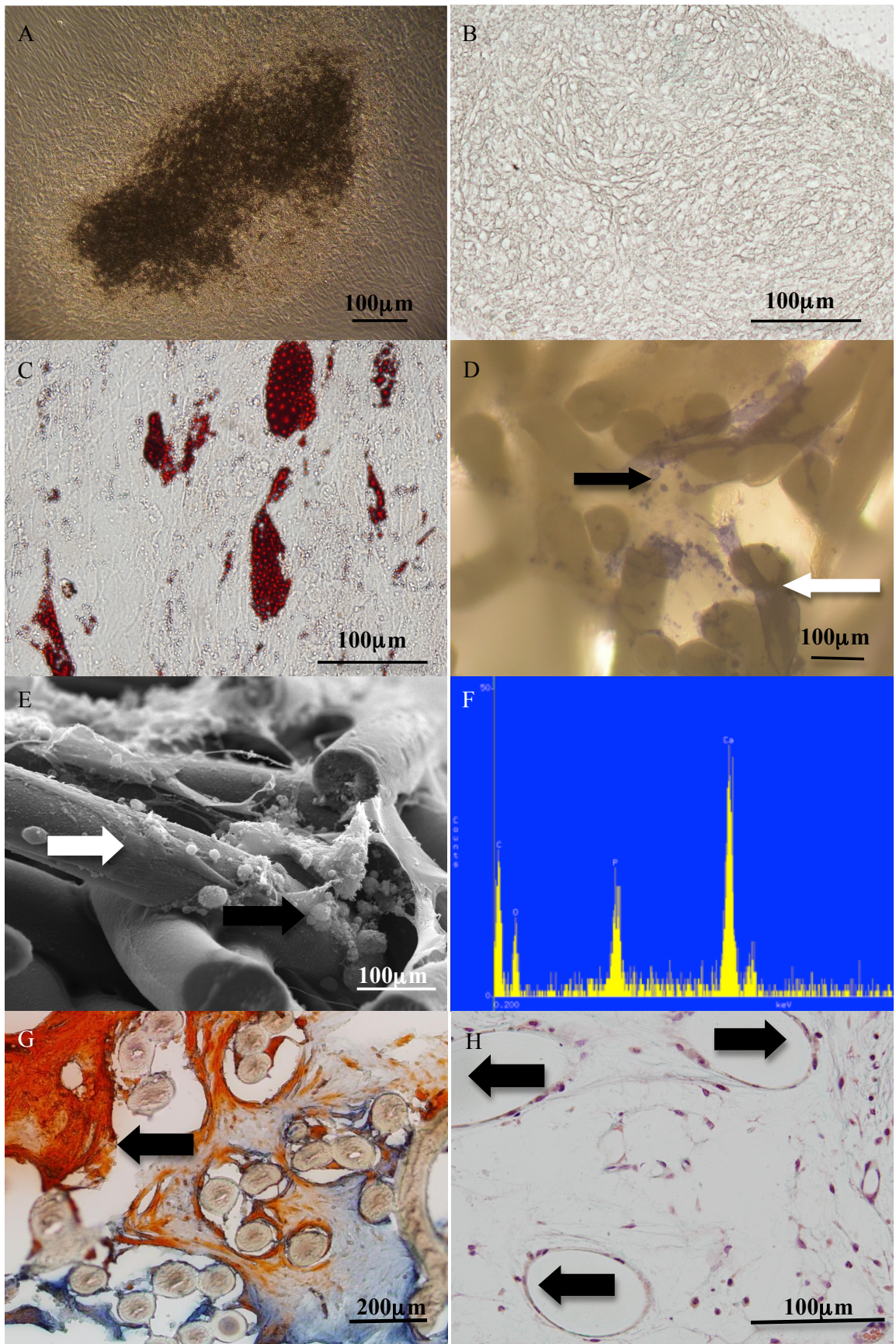
Rozdíly v diferenciaci MSC napěstovaných standardně a metodou ke klinickému použití nebyly pozorovány. K další analýze depozit bylo nejprve použito skenovacího elektronového mikroskopu. Na snímcích jsou zřetelná minerální depozita společně s vláknitou extracelulární matrix (Obrázek 5E, str. 69).

K potvrzení, že depozita vytvořená buňkami jsou hydroxyapatit, bylo užito prvkové analýzy, která ukázala poměr vápníku a fosforu 5:3 (Obrázek 5F, str. 69). Tento poměr odpovídá poměru těchto elementů v hydroxyapatitu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

4.11.2.2 *In vivo implantace 3D PLLA/PDLLA nosiče na NOD/LtSz-Rag1-modelu*

Nosiče s buňkami primoexpandovanými způsobem určeným ke klinickému užití byly implantovány 12 imunodeficientním myším (NOD/LtSz-Rag1-) subkutánně pravostranně. Levostranně u 6 pokusných zvířat byly implantovány nosiče osazené buňkami napěstované standardní metodikou jako pozitivní kontrola. Zbývajícím 6 myším byly na levou stranu voperovány nosiče bez buněk, jako negativní kontrola. Na RTG kontrolách jsme zjistili větší zastínění v oblasti nosičů s buňkami oproti negativním kontrolám. Rozdíly mezi nosiči osazenými MSC pěstovanými standardní metodikou a metodikou určenou ke klinickému využití nebyly pozorovány. Explantace byla provedena po 6-9 týdnech. Na histologických řezech je patrné, že buňky ze standardní i klinické metodiky byly schopné produkovat extracelulární matrix, která kalcifikovala a vytvářela spolu s cévním zásobením kosti podobnou strukturu (Obrázek 5G, str. 69). Na povrchu vláken nosiče se ojediněle objevila obrovskobuněčná reakce.

Buňky napěstované způsobem pro klinické využití vytvářely více kalcifikované matrix než standardně pěstované buňky.



Obrázek 5: **A:** Osteogenní diferenciacie na 2D PDLLA nosiči (4 týdny) MSC expandovaných metodikou ke klinickému použiti - von Kossovo barvení,

B: Chondrogenní diferenciaci (2 týdny) MSC expandovaných metodikou ke klinickému použití - imunohistochemické barvení na kolagen II, peroxidáza, **C:** adipogenní diferenciaci na 2D PDLLA nosiči (4 týdny) MSC expandovaných metodikou ke klinickému použití – olejová červeň, **D:** osteogenní diferenciaci (2 týdny) MSC expandovaných metodikou ke klinickému použití na 3D PLLA nosiči - hydroxyapatitová depozita (černá šipka) zřetelná ve světelném mikroskopu, buňky barví se pozitivně na alkalickou fosfatázu (bílá šipka), **E:** snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu, kde jsou zřetelná vlákna PLLA nosiče s buňkami (bílá šipka) a vláknitou extracelulární matrix s minerálními depozity (černá šipka), **F:** Prvková analýza depozit - poměr vápníku a fosforu 5:3 odpovídající hydroxyapatitu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Pytlík et al. 2009), **G:** řez PLLA nosičem osazený MSC expandovaných metodikou ke klinickému použití po 6 týdnech *in vivo* implantace (NOD/LtSz-Rag1⁻ myš) kosti podobná kalcifikovaná extracelulární matrix (černá šipka) s cévním zásobením (Ladewigova modifikace Massonova modrého trichromu), **H:** negativní kontrola – neosazený nosič (Ladewigova modifikace Massonova modrého trichromu), je patrná nízká celularita, ojedinělé cévy a malé množství extracelulární matrix myšího původu (místa po vláknech nosiče označená černými šipkami) (Pytlík et al. 2009).

Na histologických řezech negativních kontrol, tedy nosičů implantovaných bez buněk (Obrázek 5H, str. 69), je patrná nízká celularita, ojedinělé cévy a malé množství extracelulární matrix myšího původu.

Na tělech a orgánech všech pokusných zvířat nebyly nalezeny známky nádorového růstu.

Pokusy potvrdily, že NOD/LtSz-Rag1⁻ myší model je vhodný pro *in vivo* testování lidských MSC. PLLA/PDLLA nosič se osvědčil v pokusech *in vivo* na NOD/LtSz-Rag1⁻ myším modelu se standardně pěstovanými MSC, ale zejména s MSC pěstovanými pro klinické použití. Protože slibné výsledky použití MSC u jednoho živočišného druhu neznamenaají automaticky úspěch v klinické studii, bude nutné testování ještě na dalším zvířecím druhu. Největším imunodeficientním modelem přibližujícím lidské MSC, nepočítáme-li ovčí féty, je imunodeficientní potkan, proto další testování klinické metodiky by mělo probíhat na tomto modelu.

V současné době není registrována klinická studie s MSC použitými spolu s PLLA/PDLLA nosičem k regeneraci kostní tkáně. V případě, že námi pěstované MSC uspějí v klinické studii k ortotopické aplikaci bez použití nosiče, by bylo možno připravit design klinické studie s využitím nosiče. Toto by ovšem mělo být předmětem nejprve pečlivého preklinického testování.

5 Závěr

Hlavním cílem projektu byla příprava nové technologie buněčné terapie potenciálně využitelné v ortopedické klinické praxi. MSC kultivované způsobem ke klinickému užití se zdají být vhodné pro lidské použití ke stimulaci hojení kosti. Bezpečnost a zejména účinnost musí být ovšem potvrzeny v klinických studiích. Příprava klinických studií je následujícím krokem k využití těchto buněk v medicíně.

Vedlejším cílem bylo získání prekurzorových mezenchymových stromálních multipotentních buněk z kostní dřevě, jejich kultivace, charakterizace a cílená diferenciaci do buněk osteoblastové linie, což bylo potvrzeno u obou typů kultivací - jak standardní metodiky, tak u metodiky určené ke klinickým účelům.

Tento způsob stimulace hojení kosti bez použití autologního štěpu může spolu s metodami BT a TI rozšířit v ortopedii terapeutické možnosti.

Metodika pěstování MSC ke klinickému použití se zdá být rychlou a jednoduchou technologií expanze MSC k získání velkého množství mesenchymových multipotentních kmenových buněk bez potřeby primární expanze. Počet kritických kroků výroby je minimalizován a uzpůsoben výrobě v uzavřeném systému. Základní znaky buněk se shodují s charakteristikami MSC pěstovaných standardní laboratorní metodikou a splňují minimální kritéria pro MSC. Splnění podmínek správné výrobní praxe a požadavků EMA zprostředkovaně SÚKL bude zásadní k započatí klinických studií. MSC kultivované navrhovanou metodou by bylo potenciálně možno využít i pro buněčnou terapii či tkáňové inženýrství chrupavky, šlachy a popřípadě menisku. Vhodnost takto pěstovaných MSC buněk pro další neortotopické aplikace jako jsou potlačení reakce štěpu proti hostiteli, angiologické aplikace, tkáňové inženýrství dalších orgánů a jiná místní či celotělová podání je nutno ověřit další analýzou.

6 Poděkování

Tato práce byla podpořena granty ministerstva školství ČR (MSM 0021620806, 0021620808 a 0021620820) a granty ministerstva zdravotnictví ČR (IGA ND 7448, 9182-3/07 a 13531/4). Popsaná klinická metodika je chráněna Českým patentem 301 148 a Evropským patentem EU 1999250, dle Českého a mezinárodního práva.

7 Seznam zkratek

7-AAD	7-aminoactinomycin D
ALK	aktivinu podobná kináza
ALP	alkalická fosfatáza
ATB	antibiotika
ATM	antimykotika
ATMP	léčivé přípravky pro moderní terapii
BMP	kostní morfogenetický protein
BSP	kostní sialoprotein
BT	buněčná terapie
BTC	betacelulin
CAT	komise pro pokročilé terapie
CFU-F	buňky tvořící fibroblastové kolonie
CSF-1	kolonie stimulující faktor-1
DMP	dentinový matrixový kyselý fosfoprotein
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
EGF	epidermový růstový faktor
EMA	Evropská léková agentura
EPG	epigen
EPMA	elektronová mikrosonda
EPR	epiregulin
EU	Evropská unie
FACS	fluorescenční průtoková cytometrie
FBS	fetální telecí sérum
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FGF	fibroblastový růstový faktor
FITC	fluorescein izothiokyanát
GDF	růstový diferenciační faktor
GMP	správná výrobní praxe
HBSS	Hanksův solný roztok
HGF	hepatální růstový faktor
HIF	hypoxií indukovaný factor
HS	lidské sérum

HSC	hematopoetické kmenové buňky
IFN- γ	interferon γ
IGA	Interní grantová agentura
IGF	inzulinu podobný růstový faktor
IL	interleukin
LAP	latentní asociovaný peptid
LLC	dlouhý latentní komplex
M-CSF	makrofágový kolonie stimulující faktor
MACS	magneticky aktivované třídění buněk
MAPK	mitogenem aktivované proteinové kinázy
MCAM	adhesní molekula melanomových buněk
MEPE	matrixový extracelulární fosfoglykoprotein
MMP	membránová metaloproteináza
MNC	mononukleární buňky periferní krve
MSC	multipotentní mezenchymové stromální buňky
NRG	neuregulin
OCN	osteokalcin
OP 1	osteogenní protein 1
OPN	osteopontin
PBS	fosfátový pufr
PDGF	destičkový růstový faktor
PDLLA	poly(D,L-laktid)
PE	phycoerytrin
PE-Cy5	phycoerythrin- iododicarboxycyanin
PECAM	destičko-endotelová adhezivní molekula
PEO	poly(etylenoxid)
PGA	polyglykolová kyselina
PGF	placentární růstový faktor
PHEX	fosfát regulující homolog endopeptidázy na chromozomu X
PLGA	polylaktid-glykolid
PLLA	poly(L-laktid)
PNC	penicilin
PRP	na destičky bohatá plazma
PTH	parathormon

Runx2	Runt-related Transcription Factor 2
SLC	krátký latentní komplex
SMAD	similar to „mothers against decapentaplegic“
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TCP	trikalciumpfosfát
TGF	transformující růstový faktor
TI	tkáňové inženýrství
TNF	faktor nekrotizující nádory
TβR	receptor TGF- β
VCAM	adhezní molekula cévních buněk
VEGF	endotelový růstový faktor

8 Literatura

Adamzyk, C., T. Emonds, J. Falkenstein, R. Tolba, W. Jahnen-Dechent, B. Lethaus a S. Neuss (2013). "Different Culture Media Affect Proliferation, Surface Epitope Expression, and Differentiation of Ovine MSC." *Stem Cells Int* 2013: 387324.

Ahlmann, E., M. Patzakis, N. Roidis, L. Shepherd a P. Holtom (2002). "Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes." *J Bone Joint Surg Am* 84-A(5): 716-720.

Alhadlaq, A., J. H. Elisseeff, L. Hong, C. G. Williams, A. I. Caplan, B. Sharma, R. A. Kopher, S. Tomkoria, D. P. Lennon, A. Lopez a J. J. Mao (2004). "Adult stem cell driven genesis of human-shaped articular condyle." *Ann Biomed Eng* 32(7): 911-923.

Alhadlaq, A. a J. J. Mao (2005). "Tissue-engineered osteochondral constructs in the shape of an articular condyle." *J Bone Joint Surg Am* 87(5): 936-944.

Ateschrang, A., B. G. Ochs, M. Ludemann, K. Weise a D. Albrecht (2009). "Fibula and tibia fusion with cancellous allograft vitalised with autologous bone marrow: first results for infected tibial non-union." *Arch Orthop Trauma Surg* 129(1): 97-104.

Aubin, J. E. (2001). "Regulation of osteoblast formation and function." *Rev Endocr Metab Disord* 2(1): 81-94.

Bae, S. H., H. Ryu, K. J. Rhee, J. E. Oh, S. K. Baik, K. Y. Shim, J. H. Kong, S. Y. Hyun, H. S. Pack, C. Im, H. C. Shin, Y. M. Kim, H. S. Kim, Y. W. Eom a J. I. Lee (2015). "l-Ascorbic acid 2-phosphate and fibroblast growth factor-2 treatment maintains differentiation potential in bone marrow-derived mesenchymal stem cells through expression of hepatocyte growth factor." *Growth Factors*: 1-8.

Baksh, D., J. E. Davies a P. W. Zandstra (2005). "Soluble factor cross-talk between human bone marrow-derived hematopoietic and mesenchymal cells

enhances in vitro CFU-F and CFU-O growth and reveals heterogeneity in the mesenchymal progenitor cell compartment." *Blood* 106(9): 3012-3019.

Banwart, J. C., M. A. Asher a R. S. Hassanein (1995). "Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation." *Spine* 20(9): 1055-1060.

Bernardo, M. E., M. A. Avanzini, C. Perotti, A. M. Cometa, A. Moretta, E. Lenta, C. Del Fante, F. Novara, A. de Silvestri, G. Amendola, O. Zuffardi, R. Maccario a F. Locatelli (2007). "Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute." *Journal of cellular physiology* 211(1): 121-130.

Bianco, P. (2015). "Stem cells and bone: a historical perspective." *Bone* 70: 2-9.

Bonewald, L. F. (1999). "Regulation and regulatory activities of transforming growth factor beta." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 9(1): 33-44.

Bonewald, L. F. (2011). "The amazing osteocyte." *J Bone Miner Res* 26(2): 229-238.

Brauninger, S., H. Bialleck, K. Thorausch, T. Felt, E. Seifried a H. Bonig (2012). "Allogeneic donor peripheral blood "stem cell" apheresis: prospective comparison of two apheresis systems." *Transfusion* 52(5): 1137-1145.

Bucholz, R. W. (2002). "Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes." *Clin Orthop Relat Res*(395): 44-52.

Burfening, P. J., C. W. Alliston a L. C. Ulberg (1969). "Gross morphology and predictability for survival of 4-day rabbit embryos following heat-stress during the first cleavage division." *The Journal of experimental zoology* 170(1): 55-59.

Burwell, R. G. (1964). "Studies in the Transplantation of Bone. Vii. The Fresh Composite Homograft-Autograft of Cancellous Bone; an Analysis of Factors Leading to Osteogenesis in Marrow Transplants and in Marrow-Containing Bone Grafts." *J Bone Joint Surg Br* 46: 110-140.

Calori, G. M. a P. V. Giannoudis (2011). "Enhancement of fracture healing with the diamond concept: the role of the biological chamber." *Injury* 42(11): 1191-1193.

Canalis, E., K. Parker a S. Zanotti (2012). "Gremlin1 is required for skeletal development and postnatal skeletal homeostasis." *Journal of cellular physiology* 227(1): 269-277.

Carragee, E. J., G. Chu, R. Rohatgi, E. L. Hurwitz, B. K. Weiner, S. T. Yoon, G. Comer a B. Kopjar (2013). "Cancer risk after use of recombinant bone morphogenetic protein-2 for spinal arthrodesis." *J Bone Joint Surg Am* 95(17): 1537-1545.

Chaudhary, L. R., A. M. Hofmeister a K. A. Hruska (2004). "Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation." *Bone* 34(3): 402-411.

Chen, L. B., X. B. Jiang a L. Yang (2004). "Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells." *World J Gastroenterol* 10(20): 3016-3020.

Chen, X., Y. Gan, W. Li, J. Su, Y. Zhang, Y. Huang, A. I. Roberts, Y. Han, J. Li, Y. Wang a Y. Shi (2014). "The interaction between mesenchymal stem cells and steroids during inflammation." *Cell Death Dis* 5: e1009.

Chen, X., H. Xu, C. Wan, M. McCaigue a G. Li (2006). "Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Stem Cells* 24(9): 2052-2059.

Cheng, H., W. Jiang, F. M. Phillips, R. C. Haydon, Y. Peng, L. Zhou, H. H. Luu, N. An, B. Breyer, P. Vanichakarn, J. P. Szatkowski, J. Y. Park a T. C. He (2003). "Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)." *J Bone Joint Surg Am* 85-A(8): 1544-1552.

Chopp, M. a Y. Li (2002). "Treatment of neural injury with marrow stromal cells." *Lancet Neurol* 1(2): 92-100.

Coelho, M. J., A. T. Cabral a M. H. Fernande (2000). "Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM." *Biomaterials* 21(11): 1087-1094.

Connolly, J. F., R. Guse, J. Tiedeman a R. Dehne (1989). "Autologous marrow injection for delayed unions of the tibia: a preliminary report." *J Orthop Trauma* 3(4): 276-282.

Connolly, J. F., R. Guse, J. Tiedeman a R. Dehne (1991). "Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions." *Clin Orthop Relat Res*(266): 259-270.

Connolly, J. F. a R. Shindell (1986). "Percutaneous marrow injection for an ununited tibia." *Nebr Med J* 71(4): 105-107.

Dallari, D., L. Savarino, C. Stagni, E. Cenni, A. Cenacchi, P. M. Fornasari, U. Albisinni, E. Rimondi, N. Baldini a A. Giunti (2007). "Enhanced tibial osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with platelet gel or platelet gel and bone marrow stromal cells." *J Bone Joint Surg Am* 89(11): 2413-2420.

Daughaday, W. H. (1971). "Sulfation factor regulation of skeletal growth. A stable mechanism dependent on intermittent growth hormone secretion." *Am J Med* 50(3): 277-280.

Deckers, M. M., R. L. van Bezooijen, G. van der Horst, J. Hoogendam, C. van Der Bent, S. E. Papapoulos a C. W. Lowik (2002). "Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A." *Endocrinology* 143(4): 1545-1553.

Delorme, B. a P. Charbord (2007). "Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells." *Methods Mol Med* 140: 67-81.

Dilisio, M. F. (2014). "Osteonecrosis following short-term, low-dose oral corticosteroids: a population-based study of 24 million patients." *Orthopedics* 37(7): e631-636.

Djouad, F., D. Mrugala, D. Noel a C. Jorgensen (2006). "Engineered mesenchymal stem cells for cartilage repair." *Regen Med* 1(4): 529-537.

Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop a E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* 8(4): 315-317.

Donaldson, L. J., I. P. Reckless, S. Scholes, J. S. Mindell a N. J. Shelton (2008). "The epidemiology of fractures in England." *J Epidemiol Community Health* 62(2): 174-180.

Doucet, C., I. Ernou, Y. Zhang, J. R. Llense, L. Begot, X. Holy a J. J. Lataillade (2005). "Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications." *J Cell Physiol* 205(2): 228-236.

Drazin, D., F. Shweikeh, E. Wieshofer, T. T. Kim a J. P. Johnson (2014). "Public awareness of the bone morphogenic protein controversy: Evidence from news publications." *Surg Neurol Int* 5(Suppl 15): S529-535.

Einhorn, T. A. (1998). "The cell and molecular biology of fracture healing." *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl): S7-21.

Fasth, A. a O. Porras (1999). "Human malignant osteopetrosis: pathophysiology, management and the role of bone marrow transplantation." *Pediatr Transplant* 3 Suppl 1: 102-107.

Fleming, J. E., Jr., C. N. Cornell a G. F. Muschler (2000). "Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering." *Orthop Clin North Am* 31(3): 357-374.

Fredriksson, L., H. Li a U. Eriksson (2004). "The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms." *Cytokine & growth factor reviews* 15(4): 197-204.

Friedenstein, A. J., U. F. Deriglasova, N. N. Kulagina, A. F. Panasuk, S. F. Rudakowa, E. A. Luria a I. A. Ruadkow (1974). "Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method." *Exp Hematol* 2(2): 83-92.

Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova a G. P. Frolova (1968). "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." *Transplantation* 6(2): 230-247.

Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova a G. P. Frolova (1968). "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." *Transplantation* 6(2): 230-247.

Friedenstein, A. J., S. Piatetzky, II a K. V. Petrakova (1966). "Osteogenesis in transplants of bone marrow cells." *J Embryol Exp Morphol* 16(3): 381-390.

Friedlaender, G. E., S. Lin, L. A. Solchaga, L. B. Snel a S. E. Lynch (2013). "The role of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) in orthopaedic bone repair and regeneration." *Curr Pharm Des* 19(19): 3384-3390.

Fu, T. S., Y. H. Chang, C. B. Wong, I. C. Wang, T. T. Tsai, P. L. Lai, L. H. Chen a W. J. Chen (2014). "Mesenchymal stem cells expressing baculovirus-engineered BMP-2 and VEGF enhance posterolateral spine fusion in a rabbit model." *Spine J.*

Fukuchi, Y., H. Nakajima, D. Sugiyama, I. Hirose, T. Kitamura a K. Tsuji (2004). "Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential." *Stem Cells* 22(5): 649-658.

Ganger, R., C. Radler, J. Chomiak, A. Handlbauer, F. Grill a P. Dungal (2011). "[Complications after femoral lengthening with ring fixators in congenital femoral deficiency]." *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca* 78(1): 61-66.

Gangji, V., V. De Maertelaer a J. P. Hauzeur (2011). "Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: Five year follow-up of a prospective controlled study." *Bone* 49(5): 1005-1009.

Gangji, V. a J. P. Hauzeur (2005). "Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. Surgical technique." *J Bone Joint Surg Am* 87 Suppl 1(Pt 1): 106-112.

Gangji, V., J. P. Hauzeur, C. Matos, V. De Maertelaer, M. Toungouz a M. Lambermont (2004). "Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study." *J Bone Joint Surg Am* 86-A(6): 1153-1160.

Gangji, V., M. Toungouz a J. P. Hauzeur (2005). "Stem cell therapy for osteonecrosis of the femoral head." *Expert Opin Biol Ther* 5(4): 437-442.

Garg, N. K., S. Gaur a S. Sharma (1993). "Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture." *Acta Orthop Scand* 64(6): 671-672.

Garnero, P., E. Sornay-Rendu a P. D. Delmas (2000). "Low serum IGF-1 and occurrence of osteoporotic fractures in postmenopausal women." *Lancet* 355(9207): 898-899.

Gentile, A., L. Trusolino a P. M. Comoglio (2008). "The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer." *Cancer Metastasis Rev* 27(1): 85-94.

Geris, L., A. Gerisch, J. V. Sloten, R. Weiner a H. V. Oosterwyck (2008). "Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model." *J Theor Biol* 251(1): 137-158.

Giannoudis, P. V., H. Dinopoulos a E. Tsiridis (2005). "Bone substitutes: an update." *Injury* 36 Suppl 3: S20-27.

Giannoudis, P. V., T. A. Einhorn a D. Marsh (2007). "Fracture healing: the diamond concept." *Injury* 38 Suppl 4: S3-6.

Glass, G. E., J. K. Chan, A. Freidin, M. Feldmann, N. J. Horwood a J. Nanchahal (2011). "TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(4): 1585-1590.

Goel, A., S. S. Sangwan, R. C. Siwach a A. M. Ali (2005). "Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union." *Injury* 36(1): 203-206.

Gregory, C. A., E. Reyes, M. J. Whitney a J. L. Spees (2006). "Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogenic species-specific serum and administration in fibrin constructs." *Stem Cells* 24(10): 2232-2243.

Griffin, J. D., J. Ritz, L. M. Nadler a S. F. Schlossman (1981). "Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant myeloid cells." *J Clin Invest* 68(4): 932-941.

Gronthos, S., S. E. Graves, S. Ohta a P. J. Simmons (1994). "The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors." *Blood* 84(12): 4164-4173.

Gronthos, S. a P. J. Simmons (1995). "The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro." *Blood* 85(4): 929-940.

Gronthos, S., A. C. Zannettino, S. J. Hay, S. Shi, S. E. Graves, A. Kortessidis a P. J. Simmons (2003). "Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow." *J Cell Sci* 116(Pt 9): 1827-1835.

Guerrero-Esteo, M., T. Sanchez-Elsner, A. Letamendia a C. Bernabeu (2002). "Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II." *J Biol Chem* 277(32): 29197-29209.

Haasper, C., M. Colditz, L. Kirsch, T. Tschernig, J. Viering, G. Graubner, A. Runtemund, J. Zeichen, R. Meller, B. Glasmacher, H. Windhagen, C. Krettek, C. Hurschler a M. Jagodzinski (2008). "A system for engineering an osteochondral construct in the shape of an articular surface: preliminary results." *Ann Anat* 190(4): 351-359.

Halme, D. G. a D. A. Kessler (2006). "FDA regulation of stem-cell-based therapies." *N Engl J Med* 355(16): 1730-1735.

Haque, N., M. T. Rahman, N. H. Abu Kasim a A. M. Alabsi (2013). "Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy." *ScientificWorldJournal* 2013: 632972.

Hausmann, M., S. Ehnert, V. Hofmann, S. Dobele, T. Freude, U. Stockle a A. Nussler (2014). "[Use of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) for the Treatment of Pseudarthroses - Efficiency and Therapy Failure]." *Z Orthop Unfall* 152(2): 144-151.

Hayashi, H. a T. Sakai (2012). "Biological Significance of Local TGF-beta Activation in Liver Diseases." *Front Physiol* 3: 12.

Healey, J. H., P. A. Zimmerman, J. M. McDonnell a J. M. Lane (1990). "Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients." *Clin Orthop Relat Res*(256): 280-285.

Hernigou, P. a F. Beaujean (1997). "[Bone marrow in patients with pseudarthrosis. A study of progenitor cells by in vitro cloning]." *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 83(1): 33-40.

Hernigou, P. a F. Beaujean (2002). "Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting." *Clin Orthop Relat Res*(405): 14-23.

Hernigou, P., G. Daltro, P. Filippini, M. M. Mukasa a O. Manicom (2008). "Percutaneous implantation of autologous bone marrow osteoprogenitor cells as treatment of bone avascular necrosis related to sickle cell disease." *Open Orthop J* 2: 62-65.

Hernigou, P., C. H. Flouzat-Lachaniette, J. Delambre, A. Poignard, J. Allain, N. Chevallier a H. Rouard (2015). "Osteonecrosis repair with bone marrow cell therapies: state of the clinical art." *Bone* 70: 102-109.

Hernigou, P., G. Mathieu, A. Poignard, O. Manicom, F. Beaujean a H. Rouard (2006). "Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique." *J Bone Joint Surg Am* 88 Suppl 1 Pt 2: 322-327.

Hernigou, P., A. Poignard, F. Beaujean a H. Rouard (2005). "Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells." *J Bone Joint Surg Am* 87(7): 1430-1437.

Hernigou, P., A. Poignard, S. Zilber a H. Rouard (2009). "Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting." *Indian J Orthop* 43(1): 40-45.

Horiguchi, M., M. Ota a D. B. Rifkin (2012). "Matrix control of transforming growth factor-beta function." *J Biochem* 152(4): 321-329.

Horwitz, E. M., P. L. Gordon, W. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul a T. Hofmann (2002). "Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(13): 8932-8937.

Horwitz, E. M., K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, R. J. Deans, D. S. Krause, A. Keating a T. International Society for Cellular (2005). "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* 7(5): 393-395.

Horwitz, E. M., D. J. Prockop, L. A. Fitzpatrick, W. W. Koo, P. L. Gordon, M. Neel, M. Sussman, P. Orchard, J. C. Marx, R. E. Pyeritz a M. K. Brenner (1999).

"Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta." *Nature medicine* 5(3): 309-313.

Huss, R., C. Lange, E. M. Weissinger, H. J. Kolb a K. Thalmeier (2000). "Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics." *Stem Cells* 18(4): 252-260.

In 't Anker, P. S., S. A. Scherjon, C. Kleijburg-van der Keur, W. A. Noort, F. H. Claas, R. Willemze, W. E. Fibbe a H. H. Kanhai (2003). "Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation." *Blood* 102(4): 1548-1549.

Jarvinen, L., L. Badri, S. Wettlaufer, T. Ohtsuka, T. J. Standiford, G. B. Toews, D. J. Pinsky, M. Peters-Golden a V. N. Lama (2008). "Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator." *J Immunol* 181(6): 4389-4396.

Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada a C. M. Verfaillie (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." *Nature* 418(6893): 41-49.

Jiang, Y., B. Vaessen, T. Lenvik, M. Blackstad, M. Reyes a C. M. Verfaillie (2002). "Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain." *Exp Hematol* 30(8): 896-904.

Jo, C. H., Y. G. Lee, W. H. Shin, H. Kim, J. W. Chai, E. C. Jeong, J. E. Kim, H. Shim, J. S. Shin, I. S. Shin, J. C. Ra, S. Oh a K. S. Yoon (2014). "Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial." *Stem Cells* 32(5): 1254-1266.

Joensuu, K., I. Paatero, J. J. Alm, K. Elenius, H. T. Aro, T. J. Heino a T. A. Hentunen (2011). "Interaction between marrow-derived human mesenchymal stem

cells and peripheral blood mononuclear cells in endothelial cell differentiation." *Scand J Surg* 100(3): 216-222.

Kawai, M. a C. J. Rosen (2012). "The insulin-like growth factor system in bone: basic and clinical implications." *Endocrinol Metab Clin North Am* 41(2): 323-333, vi.

Kawate, K., H. Yajima, H. Ohgushi, N. Kotobuki, K. Sugimoto, T. Ohmura, Y. Kobata, K. Shigematsu, K. Kawamura, K. Tamai a Y. Takakura (2006). "Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula." *Artif Organs* 30(12): 960-962.

Keramaris, N. C., G. M. Calori, V. S. Nikolaou, E. H. Schemitsch a P. V. Giannoudis (2008). "Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF." *Injury* 39 Suppl 2: S45-57.

Kerpedjieva, S. S., D. S. Kim, D. J. Barbeau a K. Tamama (2012). "EGFR ligands drive multipotential stromal cells to produce multiple growth factors and cytokines via early growth response-1." *Stem Cells Dev* 21(13): 2541-2551.

Kim, H. J., H. Zhao, H. Kitaura, S. Bhattacharyya, J. A. Brewer, L. J. Muglia, F. P. Ross a S. L. Teitelbaum (2007). "Dexamethsone suppresses bone formation via the osteoclast." *Adv Exp Med Biol* 602: 43-46.

Kim, S. J., Y. W. Shin, K. H. Yang, S. B. Kim, M. J. Yoo, S. K. Han, S. A. Im, Y. D. Won, Y. B. Sung, T. S. Jeon, C. H. Chang, J. D. Jang, S. B. Lee, H. C. Kim a S. Y. Lee (2009). "A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast(Ossron) injection to treat fractures." *BMC Musculoskelet Disord* 10: 20.

Kitoh, H., M. Kawasumi, H. Kaneko a N. Ishiguro (2009). "Differential effects of culture-expanded bone marrow cells on the regeneration of bone between the femoral and the tibial lengthenings." *J Pediatr Orthop* 29(6): 643-649.

Kitoh, H., T. Kitakoji, H. Tsuchiya, M. Katoh a N. Ishiguro (2007). "Distraction osteogenesis of the lower extremity in patients with achondroplasia/hypochondroplasia treated with transplantation of culture-expanded bone marrow cells and platelet-rich plasma." *J Pediatr Orthop* 27(6): 629-634.

Kitoh, H., T. Kitakoji, H. Tsuchiya, M. Katoh a N. Ishiguro (2007). "Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones." *Bone* 40(2): 522-528.

Kitoh, H., T. Kitakoji, H. Tsuchiya, H. Mitsuyama, H. Nakamura, M. Katoh a N. Ishiguro (2004). "Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis--a preliminary result of three cases." *Bone* 35(4): 892-898.

Koc, O. N., S. L. Gerson, B. W. Cooper, S. M. Dyhouse, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan a H. M. Lazarus (2000). "Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy." *J Clin Oncol* 18(2): 307-316.

Kocaoemer, A., S. Kern, H. Kluter a K. Bieback (2007). "Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue." *Stem Cells* 25(5): 1270-1278.

Kruger, J. P., U. Freymannx, S. Vetterlein, K. Neumann, M. Endres a C. Kaps (2013). "Bioactive factors in platelet-rich plasma obtained by apheresis." *Transfus Med Hemother* 40(6): 432-440.

Kubies, D., F. Rypacek, J. Kovarova a F. Lednicky (2000). "Microdomain structure in polylactide-block-poly(ethylene oxide) copolymer films." *Biomaterials* 21(5): 529-536.

Kuo, C. K. a R. S. Tuan (2008). "Mechanoactive tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." *Tissue Eng Part A* 14(10): 1615-1627.

Langer, R. a J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." *Science* 260(5110): 920-926.

Lari, R., A. J. Fleetwood, P. D. Kitchener, A. D. Cook, D. Pavasovic, P. J. Hertzog a J. A. Hamilton (2007). "Macrophage lineage phenotypes and osteoclastogenesis--complexity in the control by GM-CSF and TGF-beta." *Bone* 40(2): 323-336.

Li, B., E. E. Sharpe, A. B. Maupin, A. A. Teleron, A. L. Pyle, P. Carmeliet a P. P. Young (2006). "VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization." *FASEB J* 20(9): 1495-1497.

Liberman, A. C., J. Druker, M. J. Perone a E. Arzt (2007). "Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis." *Cytokine & growth factor reviews* 18(1-2): 45-56.

Liebergall, M., J. Schroeder, R. Mosheiff, Z. Gazit, Z. Yoram, L. Rasooly, A. Daskal, A. Khoury, Y. Weil a S. Beyth (2013). "Stem cell-based therapy for prevention of delayed fracture union: a randomized and prospective preliminary study." *Mol Ther* 21(8): 1631-1638.

Lin, C. S., H. Ning, G. Lin a T. F. Lue (2012). "Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells?" *Cytotherapy* 14(10): 1159-1163.

Lin, G., G. Liu, L. Banie, G. Wang, H. Ning, T. F. Lue a C. S. Lin (2011). "Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1." *Stem Cells Dev* 20(10): 1747-1752.

Lindholm, T. S. a M. R. Urist (1980). "A quantitative analysis of new bone formation by induction in composite grafts of bone marrow and bone matrix." *Clin Orthop Relat Res*(150): 288-300.

Liu, F., L. Malaval a J. E. Aubin (2003). "Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation." *J Cell Sci* 116(Pt 9): 1787-1796.

Liu, S., R. Guo, L. G. Simpson, Z. S. Xiao, C. E. Burnham a L. D. Quarles (2003). "Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX." *J Biol Chem* 278(39): 37419-37426.

Mackay, A. M., S. C. Beck, J. M. Murphy, F. P. Barry, C. O. Chichester a M. F. Pittenger (1998). "Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow." *Tissue Eng* 4(4): 415-428.

Maes, C., L. Coenegrachts, I. Stockmans, E. Daci, A. Luttun, A. Petryk, R. Gopalakrishnan, K. Moermans, N. Smets, C. M. Verfaillie, P. Carmeliet, R. Bouillon a G. Carmeliet (2006). "Placental growth factor mediates mesenchymal cell development, cartilage turnover, and bone remodeling during fracture repair." *J Clin Invest* 116(5): 1230-1242.

Maes, C., T. Kobayashi, M. K. Selig, S. Torrekens, S. I. Roth, S. Mackem, G. Carmeliet a H. M. Kronenberg (2010). "Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels." *Dev Cell* 19(2): 329-344.

Makino, S., K. Fukuda, S. Miyoshi, F. Konishi, H. Kodama, J. Pan, M. Sano, T. Takahashi, S. Hori, H. Abe, J. Hata, A. Umezawa a S. Ogawa (1999). "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro." *J Clin Invest* 103(5): 697-705.

Malaval, L., F. Liu, P. Roche a J. E. Aubin (1999). "Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro." *J Cell Biochem* 74(4): 616-627.

Mannello, F. a G. A. Tonti (2007). "Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma;

serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold!" *Stem Cells* 25(7): 1603-1609.

Marqueze-Pouey, B., S. Mailfert, V. Rouger, J. M. Goillard a D. Marguet (2014). "Physiological epidermal growth factor concentrations activate high affinity receptors to elicit calcium oscillations." *PLoS One* 9(9): e106803.

Marsell, R. a T. A. Einhorn (2011). "The biology of fracture healing." *Injury* 42(6): 551-555.

McBride, S. H., J. A. McKenzie, B. S. Bedrick, P. Kuhlmann, J. D. Pasteris, V. Rosen a M. J. Silva (2014). "Long bone structure and strength depend on BMP2 from osteoblasts and osteocytes, but not vascular endothelial cells." *PLoS One* 9(5): e96862.

Meijer, G. J., J. D. de Bruijn, R. Koole a C. A. van Blitterswijk (2008). "Cell based bone tissue engineering in jaw defects." *Biomaterials* 29(21): 3053-3061.

Mendelson, A. a P. S. Frenette (2014). "Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration." *Nature medicine* 20(8): 833-846.

Mendez-Ferrer, S., T. V. Michurina, F. Ferraro, A. R. Mazloom, B. D. Macarthur, S. A. Lira, D. T. Scadden, A. Ma'ayan, G. N. Enikolopov a P. S. Frenette (2010). "Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche." *Nature* 466(7308): 829-834.

Meno, C., Y. Saijoh, H. Fujii, M. Ikeda, T. Yokoyama, M. Yokoyama, Y. Toyoda a H. Hamada (1996). "Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member *lefty* in mouse embryos." *Nature* 381(6578): 151-155.

Meyer, U., U. Joos a H. P. Wiesmann (2004). "Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part I." *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(4): 325-332.

Mountziaris, P. M. a A. G. Mikos (2008). "Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration." *Tissue Eng Part B Rev* 14(2): 179-186.

Muraglia, A., R. Cancedda a R. Quarto (2000). "Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model." *J Cell Sci* 113 (Pt 7): 1161-1166.

Murphy, M. B., K. Moncivais a A. I. Caplan (2013). "Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine." *Exp Mol Med* 45: e54.

Muschler, G. F., C. Nakamoto a L. G. Griffith (2004). "Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering." *J Bone Joint Surg Am* 86-A(7): 1541-1558.

Nakasaki, M., K. Yoshioka, Y. Miyamoto, T. Sasaki, H. Yoshikawa a K. Itoh (2008). "IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblasts." *Bone* 43(5): 869-879.

Ning, H., G. Lin, T. F. Lue a C. S. Lin (2011). "Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen." *Biochem Biophys Res Commun* 413(2): 353-357.

Ong, K. L., M. L. Villarraga, E. Lau, L. Y. Carreon, S. M. Kurtz a S. D. Glassman (2010). "Off-label use of bone morphogenetic proteins in the United States using administrative data." *Spine (Phila Pa 1976)* 35(19): 1794-1800.

Orozco, L., A. Munar, R. Soler, M. Alberca, F. Soler, M. Huguet, J. Sentis, A. Sanchez a J. Garcia-Sancho (2014). "Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: two-year follow-up results." *Transplantation* 97(11): e66-68.

Oryan, A., S. Monazzah a A. Bigham-Sadegh (2015). "Bone Injury and Fracture Healing Biology." *Biomed Environ Sci* 28(1): 57-71.

Otsuru, S., P. L. Gordon, K. Shimono, R. Jethva, R. Marino, C. L. Phillips, T. J. Hofmann, E. Veronesi, M. Dominici, M. Iwamoto a E. M. Horwitz (2012).

"Transplanted bone marrow mononuclear cells and MSCs impart clinical benefit to children with osteogenesis imperfecta through different mechanisms." *Blood* 120(9): 1933-1941.

Owen, M. a A. J. Friedenstein (1988). "Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors." *Ciba Found Symp* 136: 42-60.

Pereira, R. C., A. N. Economides a E. Canalis (2000). "Bone morphogenetic proteins induce gremlin, a protein that limits their activity in osteoblasts." *Endocrinology* 141(12): 4558-4563.

Phillips, A. M. (2005). "Overview of the fracture healing cascade." *Injury* 36 Suppl 3: S5-7.

Pierini, M., C. Di Bella, B. Dozza, T. Frisoni, E. Martella, C. Bellotti, D. Remondini, E. Lucarelli, S. Giannini a D. Donati (2013). "The posterior iliac crest outperforms the anterior iliac crest when obtaining mesenchymal stem cells from bone marrow." *J Bone Joint Surg Am* 95(12): 1101-1107.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig a D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* 284(5411): 143-147.

Poniatowski, L. A., P. Wojdasiewicz, R. Gasik a D. Szukiewicz (2015). "Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the Role of Growth Factors in Regulation of Fracture Healing Biology and Potential Clinical Applications." *Mediators Inflamm* 2015: 137823.

Poole, K. E., R. L. van Bezooijen, N. Loveridge, H. Hamersma, S. E. Papapoulos, C. W. Lowik a J. Reeve (2005). "Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation." *FASEB J* 19(13): 1842-1844.

Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." *Science* 276(5309): 71-74.

Pytlik, R., D. Stehlik, T. Soukup, M. Kalbacova, F. Rypacek, T. Trc, K. Mulinkova, P. Michnova, L. Kideryova, J. Zivny, P. Klener, Jr., R. Vesela, M. Trneny a P. Klener (2009). "The cultivation of human multipotent mesenchymal stromal cells in clinical grade medium for bone tissue engineering." *Biomaterials* 30(20): 3415-3427.

Quarles, L. D. (2003). "FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(1): E1-9.

Raida, M., A. C. Heymann, C. Gunther a D. Niederwieser (2006). "Role of bone morphogenetic protein 2 in the crosstalk between endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells." *Int J Mol Med* 18(4): 735-739.

Reigstad, L. J., J. E. Varhaug a J. R. Lillehaug (2005). "Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family." *FEBS J* 272(22): 5723-5741.

Richardson, S. M. a J. A. Hoyland (2008). "Stem cell regeneration of degenerated intervertebral discs: current status." *Curr Pain Headache Rep* 12(2): 83-88.

Romanov, Y. A., V. A. Svintsitskaya a V. N. Smirnov (2003). "Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord." *Stem Cells* 21(1): 105-110.

Sacchetti, B., A. Funari, S. Michienzi, S. Di Cesare, S. Piersanti, I. Saggio, E. Tagliafico, S. Ferrari, P. G. Robey, M. Riminucci a P. Bianco (2007). "Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment." *Cell* 131(2): 324-336.

Sato, M., M. Maeda, H. Kurosawa, Y. Inoue, Y. Yamauchi a H. Iwase (2000). "Reconstruction of rabbit Achilles tendon with three bioabsorbable materials: histological and biomechanical studies." *J Orthop Sci* 5(3): 256-267.

Schallmoser, K., C. Bartmann, E. Rohde, S. Bork, C. Guelly, A. C. Obenauf, A. Reinisch, P. Horn, A. D. Ho, D. Strunk a W. Wagner (2010). "Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions." *Haematologica*.

Schallmoser, K., C. Bartmann, E. Rohde, A. Reinisch, K. Kashofer, E. Stadelmeyer, C. Drexler, G. Lanzer, W. Linkesch a D. Strunk (2007). "Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells." *Transfusion* 47(8): 1436-1446.

Schallmoser, K., E. Rohde, A. Reinisch, C. Bartmann, D. Thaler, C. Drexler, A. C. Obenauf, G. Lanzer, W. Linkesch a D. Strunk (2008). "Rapid large-scale expansion of functional mesenchymal stem cells from unmanipulated bone marrow without animal serum." *Tissue Eng Part C Methods* 14(3): 185-196.

Schindeler, A., M. M. McDonald, P. Bokko a D. G. Little (2008). "Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture." *Semin Cell Dev Biol* 19(5): 459-466.

Selvaggi, T. A., R. E. Walker a T. A. Fleisher (1997). "Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions." *Blood* 89(3): 776-779.

Seshacharyulu, P., M. P. Ponnusamy, D. Haridas, M. Jain, A. K. Ganti a S. K. Batra (2012). "Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy." *Expert Opin Ther Targets* 16(1): 15-31.

Shahdadfar, A., K. Fronsdal, T. Haug, F. P. Reinholt a J. E. Brinchmann (2005). "In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability." *Stem Cells* 23(9): 1357-1366.

Shapiro, F. (2008). "Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts." *Eur Cell Mater* 15: 53-76.

- Shi, S. a S. Gronthos (2003). "Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp." *J Bone Miner Res* 18(4): 696-704.
- Shultz, L. D., P. A. Lang, S. W. Christianson, B. Gott, B. Lyons, S. Umeda, E. Leiter, R. Hesselton, E. J. Wagar, J. H. Leif, O. Kollet, T. Lapidot a D. L. Greiner (2000). "NOD/LtSz-Rag1null mice: an immunodeficient and radioresistant model for engraftment of human hematolymphoid cells, HIV infection, and adoptive transfer of NOD mouse diabetogenic T cells." *J Immunol* 164(5): 2496-2507.
- Sidney, L. E., M. J. Branch, S. E. Dunphy, H. S. Dua a A. Hopkinson (2014). "Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors." *Stem Cells* 32(6): 1380-1389.
- Simmons, P. J. a B. Torok-Storb (1991). "Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1." *Blood* 78(1): 55-62.
- Siwach, R. C., S. S. Sangwan, R. Singh a A. Goel (2001). "Role of percutaneous bone marrow grafting in delayed unions, non-unions and poor regenerates." *Indian J Med Sci* 55(6): 326-336.
- Stehlik, D., R. Pytlik, H. Rychtrmocova, L. Kideryova, R. Vesela, Z. Kopecny, T. Trc a M. Trneny (2012). "Xenogeneic protein-free cultivation of mesenchymal stromal cells - towards clinical applications." *Folia Biol (Praha)* 58(3): 106-114.
- Sundelacruz, S. a D. L. Kaplan (2009). "Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine." *Semin Cell Dev Biol* 20(6): 646-655.
- Swan, M. C. a T. E. Goodacre (2006). "Morbidity at the iliac crest donor site following bone grafting of the cleft alveolus." *Br J Oral Maxillofac Surg* 44(2): 129-133.

Takahashi, H. a M. Shibuya (2005). "The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions." *Clinical science* 109(3): 227-241.

Takai, S., H. Tokuda, Y. Hanai, A. Harada, E. Yasuda, R. Matsushima-Nishiwaki, H. Kato, S. Ogura, T. Ohta a O. Kozawa (2007). "Negative regulation by p70 S6 kinase of FGF-2-stimulated VEGF release through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblasts." *J Bone Miner Res* 22(3): 337-346.

Tholpady, S. S., A. J. Katz a R. C. Ogle (2003). "Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 272(1): 398-402.

Toma, J. G., I. A. McKenzie, D. Bagli a F. D. Miller (2005). "Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin." *Stem Cells* 23(6): 727-737.

Tsuji, K., A. Bandyopadhyay, B. D. Harfe, K. Cox, S. Kakar, L. Gerstenfeld, T. Einhorn, C. J. Tabin a V. Rosen (2006). "BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing." *Nat Genet* 38(12): 1424-1429.

Turner, N. a R. Grose (2010). "Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer." *Nature reviews. Cancer* 10(2): 116-129.

Urist, M. R. (1965). "Bone: formation by autoinduction." *Science* 150(3698): 893-899.

Urist, M. R. (1970). "A morphogenetic matrix for differentiation of bone tissue." *Calcif Tissue Res: Suppl*:98-101.

van de Kamp, J., W. Jahnen-Dechent, B. Rath, R. Knuechel a S. Neuss (2013). "Hepatocyte growth factor-loaded biomaterials for mesenchymal stem cell recruitment." *Stem Cells Int* 2013: 892065.

Vega, A., M. A. Martin-Ferrero, F. Del Canto, M. Alberca, V. Garcia, A. Munar, L. Orozco, R. Soler, J. J. Fuertes, M. Huguet, A. Sanchez a J. Garcia-Sancho (2015). "Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial." *Transplantation*.

Vishnubalaji, R., M. Al-Nbaheen, B. Kadalmani, A. Aldahmash a T. Ramesh (2012). "Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis." *Cell Tissue Res* 347(2): 419-427.

Wagner, W., S. Bork, P. Horn, D. Kronic, T. Walenda, A. Diehlmann, V. Benes, J. Blake, F. X. Huber, V. Eckstein, P. Boukamp a A. D. Ho (2009). "Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells." *PLoS One* 4(6): e5846.

Wang, B. L., W. Sun, Z. C. Shi, N. F. Zhang, D. B. Yue, W. S. Guo, S. Q. Xu, J. N. Lou a Z. R. Li (2010). "Treatment of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head with the implantation of core decompression and concentrated autologous bone marrow containing mononuclear cells." *Arch Orthop Trauma Surg* 130(7): 859-865.

Wang, H., B. Pang, Y. Li, D. Zhu, T. Pang a Y. Liu (2012). "Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells." *Cytotherapy* 14(4): 423-430.

Wang, Y., C. Wan, L. Deng, X. Liu, X. Cao, S. R. Gilbert, M. L. Boussein, M. C. Faugere, R. E. Gulberg, L. C. Gerstenfeld, V. H. Haase, R. S. Johnson, E. Schipani a T. L. Clemens (2007). "The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development." *J Clin Invest* 117(6): 1616-1626.

Wen, Q., C. Zhou, W. Luo, M. Zhou a L. Ma (2014). "Pro-osteogenic effects of fibrin glue in treatment of avascular necrosis of the femoral head in vivo by hepatocyte growth factor-transgenic mesenchymal stem cells." *J Transl Med* 12: 114.

Wen, Q., L. Zhou, C. Zhou, M. Zhou, W. Luo a L. Ma (2012). "Change in hepatocyte growth factor concentration promote mesenchymal stem cell-mediated osteogenic regeneration." *J Cell Mol Med* 16(6): 1260-1273.

Werntz, J. R., J. M. Lane, A. H. Burstein, R. Justin, R. Klein a E. Tomin (1996). "Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow." *J Orthop Res* 14(1): 85-93.

Wientroub, S., D. Goodwin, O. Khermosh a R. Salama (1989). "The clinical use of autologous marrow to improve osteogenic potential of bone grafts in pediatric orthopedics." *J Pediatr Orthop* 9(2): 186-190.

Wright, J. G., S. Yandow, S. Donaldson, L. Marley a G. Simple Bone Cyst Trial (2008). "A randomized clinical trial comparing intralesional bone marrow and steroid injections for simple bone cysts." *J Bone Joint Surg Am* 90(4): 722-730.

Yamada, Y., S. Nakamura, K. Ito, E. Umemura, K. Hara, T. Nagasaka, A. Abe, S. Baba, Y. Furuichi, Y. Izumi, O. D. Klein a T. Wakabayashi (2013). "Injectable bone tissue engineering using expanded mesenchymal stem cells." *Stem Cells* 31(3): 572-580.

Yang, Z. X., Z. B. Han, Y. R. Ji, Y. W. Wang, L. Liang, Y. Chi, S. G. Yang, L. N. Li, W. F. Luo, J. P. Li, D. D. Chen, W. J. Du, X. C. Cao, G. S. Zhuo, T. Wang a Z. C. Han (2013). "CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties." *PLoS One* 8(3): e59354.

Yasunaga, Y., H. Terayama, T. Yamasaki, M. Ishikawa a M. Ochi (2007). "[Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow mononuclear cells]." *Clin Calcium* 17(6): 910-915.

Yu, J., H. He, C. Tang, G. Zhang, Y. Li, R. Wang, J. Shi a Y. Jin (2010). "Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging." *BMC Cell Biol* 11: 32.

- Yu, Y. Y., S. Lieu, C. Lu, T. Mclau, R. S. Marcucio a C. Colnot (2010). "Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair." *Bone* 46(3): 841-851.
- Yun, Y. R., J. E. Won, E. Jeon, S. Lee, W. Kang, H. Jo, J. H. Jang, U. S. Shin a H. W. Kim (2010). "Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration." *J Tissue Eng* 2010: 218142.
- Zamzam, M. M., A. A. Abak, K. A. Bakarman, F. F. Al-Jassir, K. I. Khoshhal a M. M. Zamzami (2009). "Efficacy of aspiration and autogenous bone marrow injection in the treatment of simple bone cysts." *Int Orthop* 33(5): 1353-1358.
- Zhang, M. a B. Huang (2012). "The multi-differentiation potential of peripheral blood mononuclear cells." *Stem cell research & therapy* 3(6): 48.
- Zhao, B. a L. B. Ivashkiv (2011). "Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors." *Arthritis Res Ther* 13(4): 234.
- Zhao, D., D. Cui, B. Wang, F. Tian, L. Guo, L. Yang, B. Liu a X. Yu (2012). "Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells." *Bone* 50(1): 325-330.
- Zhao, L. R., W. M. Duan, M. Reyes, C. D. Keene, C. M. Verfaillie a W. C. Low (2002). "Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats." *Exp Neurol* 174(1): 11-20.
- Zvaifler, N. J., L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams, C. J. Edwards, J. Moss, J. A. Burger a R. N. Maini (2000). "Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals." *Arthritis Res* 2(6): 477-488.