

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Mezenchymové stromální multipotentní buňky v ortopedii
potenciace hojení kosti**

**Multipotent mesenchymal stromal cells in orthopedic
Potentiation of bone healing**

MUDr. David Stehlík

Praha 2015

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Klinika dětské a dospělé ortopedie a traumatologie
2. LF UK a FN Motol

Autor: MUDr. David Stehlík

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

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne.....

Obhajoba se koná dne.....vhod. kde.....

S disertací je možno se před obhajobou seznámit na oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky děkanátu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Obsah:

| | |
|--|----|
| Souhrn..... | 4 |
| Abstract..... | 4 |
| 1 Úvod..... | 5 |
| 1.1 Hojení kosti..... | 5 |
| 1.2 Mezenchymové stromální multipotentní buňky..... | 5 |
| 1.3 Stimulace hojení kosti pomocí MSC..... | 6 |
| 1.4 Nosiče..... | 6 |
| 1.5 Model NOD/LtSz-Rag1 ⁻ pro in vivo experiment..... | 6 |
| 1.6 Legislativa..... | 6 |
| 2 Hypotézy a cíle práce:..... | 7 |
| 3 Metodika..... | 8 |
| 3.1 Odběr MSC a zpracování kostní krve..... | 8 |
| 3.2 Media, suplementy a kultivační nádoby..... | 8 |
| 3.3 Standardní primární kultivace MSC..... | 8 |
| 3.4 Kokultivace MSC s alogenními monocyty periferní krve..... | 8 |
| 3.5 MSC kultivace ke klinickému použití..... | 8 |
| 3.6 Antigenní analýza buněk..... | 9 |
| 3.7 Stanovení počtu MSC po primární expanzi..... | 9 |
| 3.8 Průkaz diferenciační schopnosti..... | 9 |
| 3.9 PLLA/PDLLA nosiče..... | 9 |
| 3.9.1 Adherence a diferenciace na 2D površích..... | 9 |
| 3.9.2 3D nosiče in vitro..... | 10 |
| 3.9.3 In-vivo implantace 3D nosičů..... | 10 |
| 3.10 Statistická analýza..... | 10 |
| 4 Výsledky a diskuze..... | 11 |
| 4.1 Odběr a zpracování kostní krve..... | 11 |
| 4.2 Standardní primární kultivace MSC..... | 11 |
| 4.3 Kokultivace MSC s alogenními monocyty periferní krve..... | 11 |
| 4.4 MSC kultivace ke klinickému použití..... | 11 |
| 4.5 Antigenní analýza buněk primární expanze..... | 13 |
| 4.6 Stanovení počtu MSC po primární expanzi..... | 13 |
| 4.7 Stanovení BMP 2, BMP 7 a osteokalcinu..... | 13 |
| 4.8 Průkaz diferenciační schopnosti primokultivací MSC..... | 14 |
| 4.9 PLLA/PDLLA nosiče..... | 14 |
| 4.9.1 Adherence, kultivace a diferenciace na 2D nosičích..... | 14 |
| 4.9.2 3D nosiče..... | 17 |
| 5 Závěr..... | 18 |
| 6 Poděkování..... | 18 |
| 7 Literatura..... | 19 |
| 8 Seznam publikací..... | 20 |

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.

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 polylactic 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.

1 Úvod

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 [1]. Dojde-li k deficitu jedné či více těchto složek, je hojení kosti ohroženo. Jediný materiál, který v současné době toto splňuje, je autologní kostní štěp.

Zásadní roli v hojení kostí hrají mezenchymové kmenové buňky (MSC). Hlavními zdroji MSC pro hojení kosti jsou periost, endost a svalová tkáň. Kostní tkáň je schopná se zhojit bez vazivové jizvy a zrestaurovat svoje biomechanické vlastnosti *ad integrum* [2]. 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 [3]. Nově vznikající osteony postupně překlenou linii lomu a tak se mechanická odolnost navrácí později než u sekundárního hojení [2]. Pouze primární hojení nastává výjimečně.

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 [4]. Sekundární hojení kosti probíhá ve 3 základních fázích: zánětlivá fáze, fáze proliferativní a fáze remodelace [5].

1.2 Mezenchymové stromální multipotentní buňky

Buňky s velkou proliferační aktivitou nacházející se ve stromatu kostní dřevě byly pozorovány Friedensteinem v roce 1966 [6]. Následně Friedenstein a další autoři poukázali na schopnost buněk diferencovat se do osteogenní, adipogenní a chondrogenní buněčné linie [7]. Dalším studiem byly tyto buňky identifikovány a nazvány mezenchymové kmenové buňky [8]. MSC jsou různorodou populací progenitorových buněk s různou diferenciací kapacitou.

Mezinárodní společností pro buněčnou terapii (ISCT) byla stanovena minimální kritéria pro MSC [9]. 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 nacházející se v kostní dřevě a periostu hrají ústřední roli ve fyziologické regeneraci kosti [10]. Populace MSC pozitivních na nestin je významnou součástí niky kostní dřevě spolu s hematopoetickými

kmenovými buňkami a jejich více diferencovanými formami jako makrofágy, megakaryocyty, lymfocyty, endotelovými buňkami, pericyty, osteoblasty, vlákny sympatiku a dalšími [11].

1.3 Stimulace hojení kosti pomocí MSC

MSC hrají zásadní roli v regeneraci kosti [1] 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. Nejstarší zdokumentované použití MSC proběhlo v rámci použití autologního kostního štěpu [12], kde jsou MSC přirozeně přítomny. Dalším způsobem stimulace hojení kosti MSC je použití nativní [13] nebo koncentrované [14] kostní dřeně. Aplikace *in vitro* pěstovaných MSC [15] v rámci buněčné terapie nebo tkáňového inženýrství patří mezi nejmodernější terapie. Počet klinických studií s MSC v registrech přesahuje 200 (www.clinicaltrialregistar.eu, www.who.int/ictrp, www.clinicaltrials.gov). Výsledky jsou ale publikovány pouze sporadicky.

1.4 Nosiče

Současná legislativa prozatím neumožnila standardní klinické použití umělé náhrady kosti osídlené lidskými buňkami. V experimentech na zvířecích modelech jsou testovány různé nosiče. Materiály, ze kterých jsou nosiče vyráběny lze rozdělit do 3 skupin: syntetické polymery (na bázi laktidu, glykolu atd.), přírodní vysokomolekulární nosiče (kolagen, chitosan, agrekan), keramické materiály (hydroxyapatit, trikalciumfosfát) nebo jejich kompozity [16]. Biokompatibilita je samozřejmým předpokladem ke klinickému použití takového systému.

1.5 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 [17] a také jsou radiorezistentní. Tento model přihoduje lidské MSC i hematopoetické kmenové buňky, periferní monocyty a lidskou pupečnickovou krev [17].

1.6 Legislativa

Použití MSC v medicíně je ve vyspělých zemích přísně regulováno. Pro Českou republiku jsou závazná nařízení vydávaná Evropská lékovou agenturou 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)**. Finanční náklady i časové nároky jsou proto velmi vysoké.

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 dřevě, 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 diferenciac
- 2) Analýza adherence, kultivace a diferenciac MSC na plochých polylaktidových nosičích *in vitro*.
- 3) Analýza kultivace a diferenciac 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 a zpracování kostní krve

Dárci MSC byli pacienti podstupující diagnostickou či stagingovou trepanobiopsii na 1. Interní klinice - hematologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Dárci byli řádně poučeni a poskytli informovaný souhlas. Odběr 10 ml kostní krve bylo provedeno z oblasti *spina iliaca posterior superior*. Kostní krev byla rozředěna v poměru 1:1 s Hanksovým solným roztokem (HBSS) s přídavkem Heparinu.

3.2 Media, suplementy a kultivační nádoby

Medium CellGro™ bylo zakoupeno od firmy CellGenix (SRN). Alpha-MEM, EDTA-trypsin, glutamin, antibiotika a fetální telecí sérum (FBS), fosfátový pufr (PBS) a HBSS byli zakoupeny od Gibco (VB). Ficoll-Paque™ PLUS byl koupen od GE Healthcare Bio-Science AB (Švédsko). Dexametazon byl koupen od Sigma-Aldrich (SRN), insulin od Eli Lilly (ČR), kyselina askorbová od firmy Biotica (ČR). EGF a PDGF-BB byly koupeny od BD Biosciences (USA) a M-CSF a FGF-2 od firmy R&D (USA). Lidské sérum (HS) bylo získáno smícháním a rekalcifikací 5 jednotek AB Rh negativní plazmy, zakoupených od Ústavu hematologie a krevní transfúze (ČR). Kultivační nádoby byly od TPP (Švýcarsko), RoboFlasks™ od Corning (USA) a FALCON HTS FluoroBlok™ Insert od Scientific Laboratory Supplies Ltd. (VB).

3.3 Standardní primární kultivace MSC

Buňky získané centrifugací na Ficollu byly nasazovány v počtu $10^5/\text{cm}^2$ kultivační láhve do 10ml media. Standardní medium obsahovalo alpha-MEM s 10% FBS, 2 mmol glutaminu, PNC G, Streptomycin a Amfotericin B. Po 24 h byly neadherující buňky odstraněny PBS a přidáno 10ml čerstvého média. Kultivace trvala 2-6 týdnů v inkubátorech (5% CO₂, 37 °C) a sklizení probíhalo 1% trypsinem.

3.4 Kokultivace MSC s alogenními monocyty periferní krve

MSC z primární expanze byly nasazovány do standardního media v počtu 10^5 do 1.-5. jamky 6 jamkové destičky. Do jamek byly přidávány mononukleární buňky periferní krve od dárců v počtu 5×10^4 1. jamka, 2×10^5 2. jamka, 5×10^5 3. jamka, 10^6 4. a 6. jamka. Jako kontrola sloužila 5.jamka, kde byly pouze MSC. Kokultury byly po 2 týdnech obarveny krystalovou violetí.

3.5 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, Kobyłka P, Rypáček P, Stehlík D, Trč T, et al.). Expanzní medium bylo založeno na CellGro™ s 10% HS, 1% penicilinu a streptomycinu, insulinu, dexametazonu, kyselině askorbové, EGF, PDGF-BB, M-CSF a FGF-2. Kultivace probíhala buď v kultivačních láhvích TPP či RoboFlasks™. Neadherentní buňky nebyly odmyty, medium nebylo měněno, suplementy byly přidávány dvakrát týdně a buňky byly sklizeny 1% trypsinem.

3.6 Antigenní analýza buněk

Průtoková cytometrie (FACS) byla prováděna na přístroji FACSCalibur (BD Biosciences Immunocytometry Systems, USA). Analyzováno bylo 10^5 buněk ve 100 μ l PBS. Inkubace probíhala 30 minut za pokojové teploty bez přístupu světla. Protilátky byly zakoupeny od BD Biosciences Pharmingen (Belgie), DakoCytomation (ČR), R&D Systems (USA), Sigma-Aldrich (SRN) a PeproTech (USA). Pozitivní pro daný antigen byly stanoveny buňky s fluorescencí větší než horních 5% kontroly.

3.7 Stanovení počtu MSC po primární expanzi

Po primární expanzi byly neadherentní buňky odmyty a sklizeny. Nejprve byl stanoven celkový počet sklizených buněk (n) na hemocytometru Beckman-Coulter AcTdiff2 (USA) a dále byla provedena FACS analýza 7-AAD, CD45 a CD235a. Samotný výpočet množství MSC byl prováděn dle vzorce:

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

3.8 Průkaz diferenciační schopnosti

Diferenciace byla prováděna standardními postupy. 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 PNC, streptomycinem, a amfotericinem B. Adipogenní indukční medium obsahovalo alpha-MEM s 10% FBS, 2 mmol glutaminu, 1% PNC a streptomycinu, 1 μ mol dexametazonu, 0,2 mmol indometacinu, 0,01 mg/ml insulinu a 0,5 mmol 3-isobutyl-1-methyl-xanthinu a udržovací medium alpha-MEM s 10% FBS, 2 mmol glutaminu, 0,01 mg/ml insulinu s 1% PNC a streptomycinu. Chondrogenní diferenciace byla indukována alpha-MEM s 50 ng/ml TGF- β 1 nebo CellGroTM médiem s FGF-2, PDGF-BB, EGF a TGF- β 1 nasazením a agregací 10^6 MSC v kónických zkumavkách Sarstedt (SRN). Osteogenní diferenciace byly barveny na ALP (Leukocyte ALP Kit) nebo von Kossovým barvením. Adipogenní diferenciace byly barveny olejovou červení. Chondrogenní diferenciace byly fixovány, krájeny a barveny hematoxylin-eozinem, toluidinovou modří a protilátkami proti kolagenu II v Ústavu histologie a embryologie (Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové)

3.9 PLLA/PDLLA nosiče

Pro výrobu plochých nosičů byl syntetizován vysokomolekulární poly(L-laktid) (PLLA) a poly(D,L-laktid) (PDLLA) z monomeru laktidu od firmy Sigma-Aldrich (SRN). Ploché (2D) (PLLA, PDLLA, 23000/10000 a 6000/5000 mPEO/PDLLA) a následně trojrozměrné (3D) PLLA/PDLLA nosiče byly vyrobeny v Institutu makromolekulární chemie Akademie věd České republiky.

3.9.1 Adherence a diferenciace na 2D površích

Testovány byly polylaktidové 2D nosiče, plast a čisté krycí sklíčko. MSC byly nasazeny v koncentraci $10^4/cm^2$ a kultivovány 3 hodiny. Byla provedena fotodokumentace a odečet množství adherovaných buněk. Dále probíhala adipogenní a osteogenní diferenciace. Vzorky byly barveny na ALP, von

Kossovým barvením a olejovou červení. Kultury na površích 30mm sklíček byly analyzovány FACS na osteokalcin a ALP.

3.9.2 3D nosiče *in vitro*

Strukturu 3D nosiče tvořila vlákna PLLA [18] potažená a spojená PDLLA. Na nosiče bylo nasazeno 10^5 MSC v komůrkách FALCON HTS FluoroBlok™ Insert s 3 μ m filtrovací membránou. Po 24 hodinách byly nosiče přeneseny do 24 jamkové kultivační destičky do standardního a osteogenního média. Vzorky byly barveny na ALP a barvením von Kossovým.

Analýza elektronovou mikroskopií byla provedena na Jeol 6400 v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze. Prvková analýza byla provedena pomocí elektronové mikrosondy na rastrovacím elektronovém mikroskopu Hitachi na Fakultě chemické technologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Další 3D nosiče z osteogenní diferenciací byly impregnovány, krájeny na tenké řezy a 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)

3.9.3 *In-vivo* implantace 3D nosičů

Pokus na myším modelu byl v souladu s legislativou schválen ústavní komisí pro práci s laboratorními zvířaty. Na 3D nosiče byly nasazeny MSC v počtu 2×10^5 . Osazené nosiče byly nejprve kultivovány 3 týdny *in vitro* v osteogenním médiu a poté implantovány NOD/LtSz-Rag1⁻ myši v intraperitoneální fenobarbitalové anestezii. Řezem v oblasti pravých dolních žeber byl v laminárním boxu podkožně implantován nosič s buňkami z kultivace ke klinický účelům. Druhostranně byl implantován nosič buď osazený buňkami pocházejícími ze standardní expanze jako pozitivní kontrola nebo neosazený nosič jako kontrola negativní. Pokusná zvířata byla chována v nepatogenním prostředí, krmena sterilní stravou a acidifikovanou vodou s antibiotiky. Třetí a šestý týden byly myši podrobeny RTG vyšetření 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 v Ústavu histologie a embryologie (Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové). Histologické řezy nosičů byly barveny Ladewigovou modifikací Massonova modrého trichromu.

3.10 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 a zpracování kostní krve

Při odběrech nebyly zaznamenány vážné komplikace a nežádoucí reakce. 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 [19]. Zpracováním 10ml kostní krve byl získán dostatek buněk k primární expanzi pro celotělovou dávku.

4.2 Standardní primární kultivace MSC

Pěstování MSC z mononukleární frakce buněk kostní krve se stalo rutinní metodikou. Dodržování operačních postupů výroby eliminovalo riziko kontaminace při kultivaci. Buňky nabývaly typické vřetenovité vzezření MSC. Takto získané MSC jsou vhodné jako referenční vzorky, provádění dalších pokusů a lze je pasážovat i dlouhodobě.

4.3 Kokultivace MSC s alogenními monocyty periferní krve

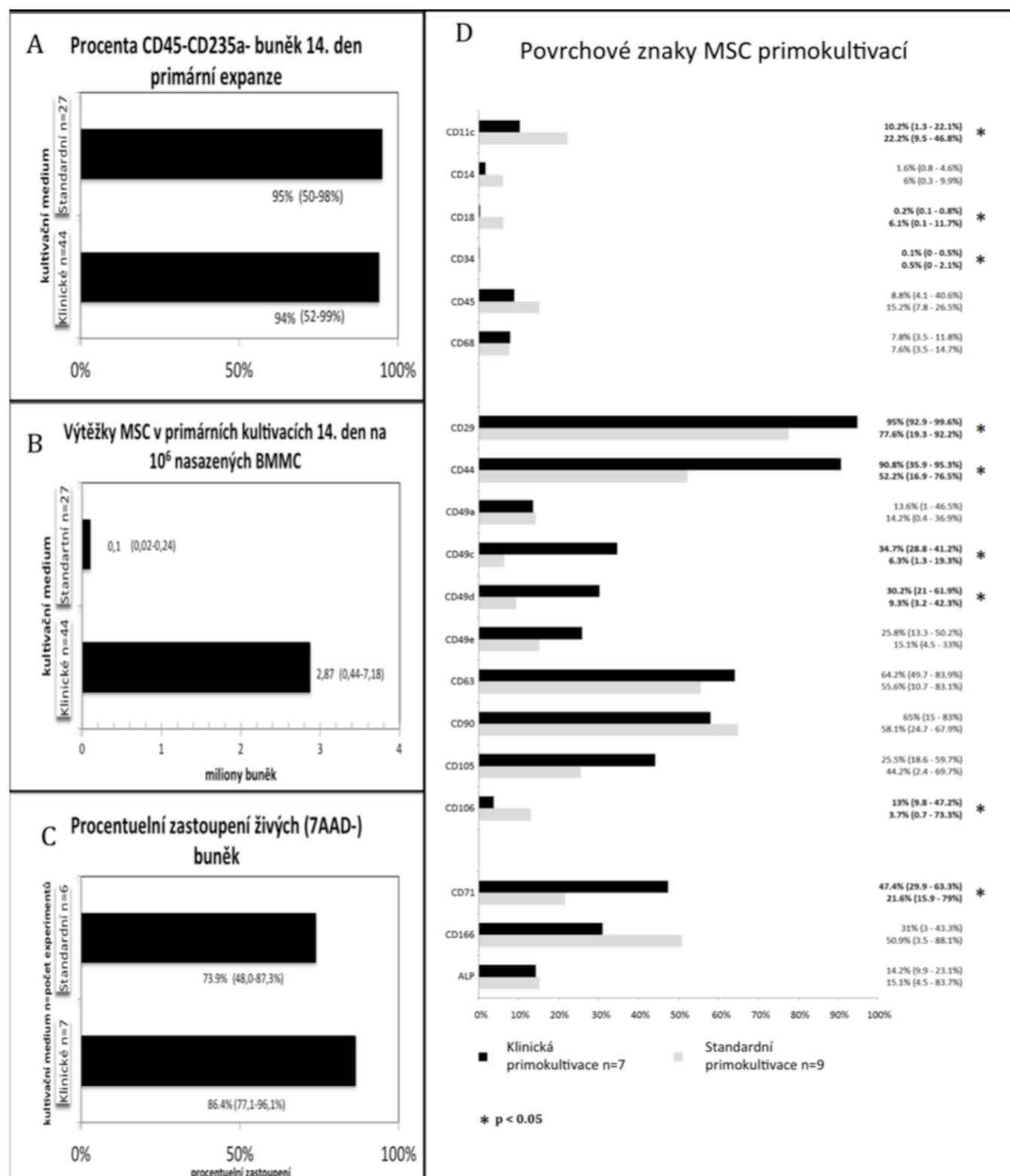
Nejprve bylo v kultivačním médiu 10%FBS nahrazeno 10% HS. MSC z primární expanze byly nasazeny do media na bázi α MEM s 10% HS. Kolonie byly velmi malé, stejně tak jejich počet. Bylo zřejmé, že FBS obsahuje růstové faktory, které jsou pro expanzi MSC nepostradatelné.

Monocyty jsou snadným zdrojem růstových faktorů. Za přítomnosti monocytů byly MSC schopny sekundární expanze. Zvětšujícím se počtem monocytů docházelo k zvětšování kolonií. Protože ale efekt nebyl uniformní, primární expanze v α MEM s HS selhávala a při klinické aplikaci by bylo pravděpodobně třeba velkého množství monocytů a alogenní kontaminace MSC preparátu by byla nežádoucí, bylo od dalších pokusů ustoupeno. 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 důvodů, proč není nezbytně nutné, abychom neadherentní buňky z kostní krve v primární expanzi odstraňovali. V nedávné době byl podobný kokultivační systém popsán pro diferenciaci endotelových buněk [20]. 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.

4.4 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. Kolonie postupně nabývaly vrstevnatého charakteru. Po ukončení primární expanze byly neadherentní buňky odmyty. Kontaminace bílou či červenou krevní řadou nebyla statisticky významně vyšší, než při standardní primární expanzi s odmytím neadherentní složky již na počátku

kultivace (Tabulka č.1, graf A, str. 12). Pro klinické využití bude nutné používat růstové faktory schválené ke klinickým účelům.



Tab. 1: Grafy: A: Procento dvojité 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 vztaheny na 10^6 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 ($p<0,05$). [21]

4.5 Antigenní analýza buněk primární expanze

Standardně primoexpandované buňky splňovaly minimální antigenní kritéria definice MSC stanovená ISCT (Tab. 1, graf D, str. 12). 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% (Tab. 1, graf C, str. 12). Testovány byly i další významné buněčné antigeny patřící adhezivním molekulám a receptorům (Tab. 1, graf D, str. 12).

Klinicky pěstované buňky statisticky významně více exprimovaly CD44. Statisticky významně více tyto MSC exprimovaly i CD29 (β 1-integrin), CD 49c, CD49d (α 3 a α 4 integrin) patřící mezi adhezivní molekuly (Tab. 1, graf D, str. 12). Nezanedbatelná byla vysoká 7-AAD negativita, která svědčila o vyšší viabilitě buněk, ale ve srovnání se standardně pěstovanými buňkami tento rozdíl nenabyl statistické významnosti ($p < 0,5$) (Tab. 1, graf C, str. 12).

4.6 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 výrobě MSC standardní způsobem byly dosahovány výtěžky s mediánem $1,0 \times 10^5$ ($0,02 - 0,24 \times 10^6$) na milión nasazených BMMC (Tab. 1, graf B, str. 12). Celotělovou i.v. dávku MSC, za kterou je považováno přibližně 1×10^6 MSC/kg pacienta [22] bylo možno vypěstovat při odběru 10ml kostní krve za 6 týdnů.

Buňky expandované způsobem použitelným ke klinické aplikaci měly výtěžky téměř 40 násobně vyšší. Medián zisků byl $2,87 \times 10^6$ ($0,44 - 7,18 \times 10^6$) na milión nasazených BMMC (Tab. 1, str. 12, graf B). Rozdíly ve výtěžcích byly statisticky významné ($p < 0,0001$). Touto metodou lze spolehlivě celotělovou dávku 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.

4.7 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 postproliferačních osteoblastů, proto byla BMP 2 a BMP7 pozitivita posuzována samostatně v osteokalcin negativní a pozitivní frakci. 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 [23]. BMP 2 působí jako chemoatraktant MSC a hraje zásadní roli v proliferaci a diferenciaci MSC [24]. 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. 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.

4.8 Průkaz diferenciační schopnosti primokultivací MSC

K průkazu diferenciačních schopností MSC byly použity buňky 6 dárců. MSC byly kultivovány duplicitně v diferenciačních médiích. Buňky obou primokultivačních metodik vytvářely kostní uzlíky a barvily se pozitivně von Kossovým barvením a barvením na ALP (Obr. 1, str. 15). V adipogenní kultivaci vytvářely měchýřkovité struktury barvící se pozitivně olejovou červení (Obr. 1, str. 15). V chondrogenní diferenciaci se vytvořená extracelulární matrix barvila pozitivně alcianovou modří a protilátkami proti kolagenu typu II (Obr. 2B, str. 16). Výsledný buněčný produkt z obou způsobů kultivace splnil kritéria ISCT pro MSC.

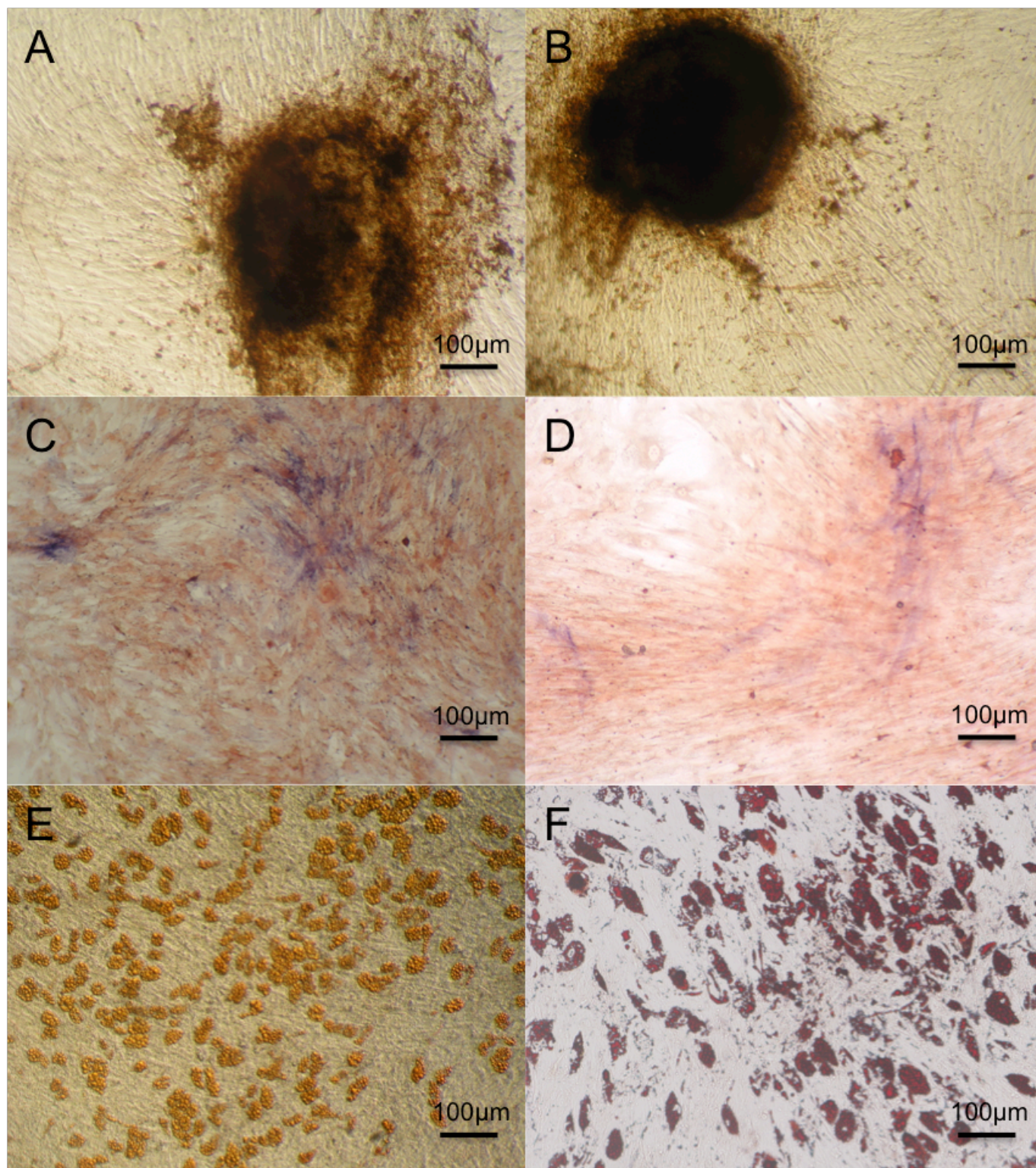
4.9 PLLA/PDLLA nosiče

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.

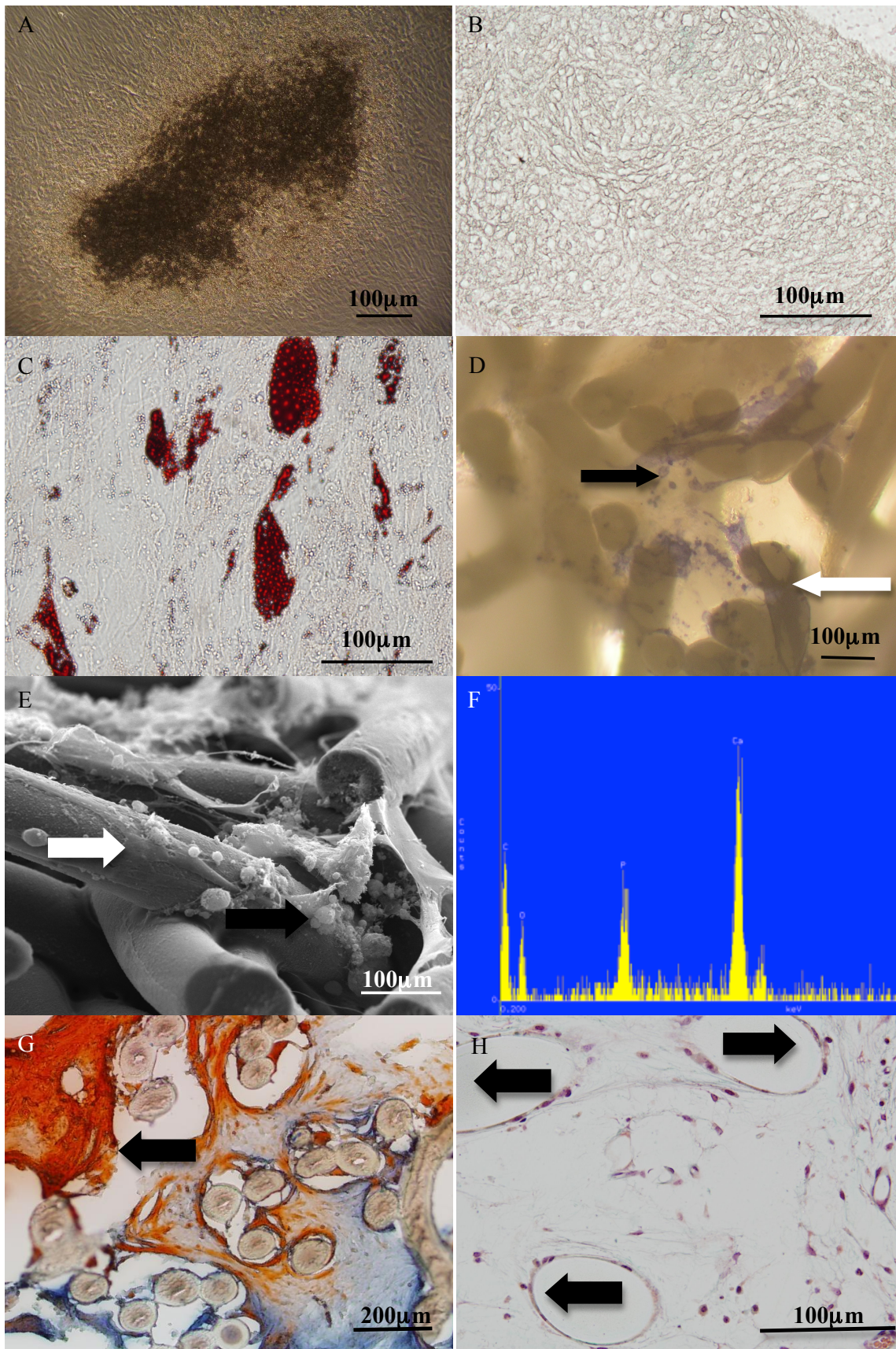
4.9.1 Adherence, kultivace a diferenciaci na 2D nosičích

Z testovaných povrchů byla adherence nejnižší u PEO kopolymerů bez statisticky významného rozdílu. Nejvyšší adherence MSC byla na samotný plast, PLLA a PDLLA, kde nebyl statisticky významný rozdíl. PEO kopolymery by bylo možno použít k výrobě nosiče, který by na svém povrchu nesl epitopy k selektivní adhezi buněk. Nicméně MSC byly schopny se i na PEO povrchy navázat, proliferovat i diferencovat. MSC se v adipogenním médiu diferencovaly na všech materiálech do buněk, které obsahovaly vakuoly barvící se olejovou červení a morfologicky nabývaly vzhled adipocytů (Obr. 2C, str. 16). V osteogenním médiu se na všech površích 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 površích (Obr. 2A, str. 16). Naopak nejméně deposit bylo pozorováno na skle. FACS analýza ALP a osteokalcinu ukázala největší pozitivitu buněk z PLLA a PDLLA, lze tak usuzovat na pokročilejší osteogenní diferenciaci.



Obr. 1: 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 ALP (pozitivní buňky se barví modře), dobarveno neutrální červení. **D:** osteogenní diferenciacie, MSC primokultivované metodikou pro klinické účely, barvení na ALP (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).



Obr. 2: MSC expandovány metodikou ke klinickému použití **A:** Osteogenní diferenciace na 2D PDLLA nosiči (4 týdny) - von Kossovo barvení, **B:** Chondrogenní diferenciace (2 týdny) - imunohistochemické barvení na kolagen II, peroxidáza, **C:** adipogenní diferenciace na 2D PDLLA nosiči (4 týdny) – olejová červec, **D:** osteogenní diferenciace (2 týdny) na 3D PLLA nosiči - hydroxyapatitová depozita (černá šipka) zřetelná ve světelném mikroskopu, buňky barví se pozitivně na ALP (bílá šipka), **E:** snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu, 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 ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) [21], **G:** řez PLLA nosičem osazeným MSC 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) [21].

4.9.2 3D nosiče

Vyrobený nosič měl porozitu $70\% \pm 4\%$ a medián průměru vláken byl $70 \mu\text{m}$. Pelety nosiče měly průměr 5mm a tloušťku 1,5mm. Vlákná PLLA byla pokryta kontinuální hladkou vrstvou PDLLA, která vlákna navzájem pojila. Spojité prostory dosahovaly velikosti 100-400 μm . Nejprve proběhly kultivační a diferenciační pokusy *in vitro* a poté následovalo použití nosiče *in vivo*. MSC zachycené v konstrukci byly schopny celý nosič kolonizovat. Postupně prostory mezi polylaktidovými vlákny buňky přemostňovaly. Buňky využívaly povrchové části nosiče a směrem do středu nosiče jich ubývalo. V elektronovém mikroskopu bylo patrné, že buňky na nosiči ve standardním médiu vyplňují prostory mezi vlákny a produkují extracelulární matrix. V osteogenním médiu byla ve světelném mikroskopu zřetelná depozita, kterých s postupem času depozit přibývalo. Tato depozita se barvením von Kossa barvila černě. Buňky se barvily pozitivně v barvení na ALP, tedy modře (Obr. 2D, str. 16). Imunohistochemická barvení, nosičů osazených MSC z obou metodik po 4 týdnech v osteogenním médiu, byla pozitivní na kolagen typu I, kostní sialoprotein i osteonektin. Na snímcích z skenovacího elektronového mikroskopu jsou zřetelná minerální depozita (Obr. 2E, str. 16) u kterých prvková analýza ukázala poměr vápníku a fosforu 5:3 identický jako v hydroxyapatitu (Obr. 2F, str. 16).

Při *in vivo* experimentech byly nosiče s buňkami primoexpandovanými způsobem určeným ke klinickému užití implantovány 12 imunodeficientním myším 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. Na histologických řezech explantátů 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 (Obr. 2G, str. 16). Na povrchu vláken nosiče se ojediněle objevila obrovskobuněčná reakce. Buňky napěstované způsobem pro klinické využití vytvářely více mineralizované matrix než standardně pěstované buňky. Na histologických řezech nosičů implantovaných bez buněk (Obr. 2H, str. 16), 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.

Slibné výsledky použití MSC u jednoho živočišného druhu neznamenaají automaticky úspěch v klinické studii, proto bude nutné testování ještě na dalším zvířecím druhu. V současné době není registrována klinická studie s MSC a PLLA/PDLLA nosičem k regeneraci kostní tkáně. V případě úspěchu klinické studie s ortotopickou aplikací samotných MSC, by bylo možno připravit další studii s využitím nosiče. To ovšem musí být předmětem nejprve 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 dřeně, jejich kultivace, charakterizace a cílená diferenciaci do buněk osteoblastové linie, čehož bylo dosaženo nejen standardní metodikou, ale i nově vyvinutou metodikou určenou ke klinickým účelům.

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 dalšími experimenty.

Stimulace hojení kosti autogenními MSC pěstovanými inovativní metodikou bez použití autologního štěpu může spolu s metodami buněčné terapie a zejména tkáňového inženýrství rozšířit terapeutické možnosti v ortopedii a traumatologii.

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 Literatura

1. Calori, G.M. aP.V. Giannoudis, *Enhancement of fracture healing with the diamond concept: the role of the biological chamber*. Injury, 2011. **42**(11): p. 1191-3.
2. Marsell, R. aT.A. Einhorn, *The biology of fracture healing*. Injury, 2011. **42**(6): p. 551-5.
3. Einhorn, T.A., *The cell and molecular biology of fracture healing*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S7-21.
4. Schindeler, A., et al., *Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(5): p. 459-66.
5. Oryan, A., et al., *Bone Injury and Fracture Healing Biology*. Biomed Environ Sci, 2015. **28**(1): p. 57-71.
6. Friedenstein, A.J., et al., *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. J Embryol Exp Morphol, 1966. **16**(3): p. 381-90.
7. Owen, M. aA.J. Friedenstein, *Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors*. Ciba Found Symp, 1988. **136**: p. 42-60.
8. Horwitz, E.M., et al., *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2005. **7**(5): p. 393-5.
9. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
10. Chaudhary, L.R., et al., *Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation*. Bone, 2004. **34**(3): p. 402-11.
11. Mendelson, A. aP.S. Frenette, *Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration*. Nat Med, 2014. **20**(8): p. 833-46.
12. Fleming, J.E., Jr., et al., *Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering*. Orthop Clin North Am, 2000. **31**(3): p. 357-74.
13. Hernigou, P. aF. Beaujean, *Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting*. Clin Orthop Relat Res, 2002(405): p. 14-23.
14. Hernigou, P., et al., *Percutaneous implantation of autologous bone marrow osteoprogenitor cells as treatment of bone avascular necrosis related to sickle cell disease*. Open Orthop J, 2008. **2**: p. 62-5.
15. Liebergall, M., et al., *Stem cell-based therapy for prevention of delayed fracture union: a randomized and prospective preliminary study*. Mol Ther, 2013. **21**(8): p. 1631-8.
16. Sundelacruz, S. aD.L. Kaplan, *Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine*. Semin Cell Dev Biol, 2009. **20**(6): p. 646-55.
17. Shultz, L.D., et al., *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, 2000. **164**(5): p. 2496-507.
18. Kubies, D., et al., *Microdomain structure in polylactide-block-poly(ethylene oxide) copolymer films*. Biomaterials, 2000. **21**(5): p. 529-36.
19. Pierini, M., et al., *The posterior iliac crest outperforms the anterior iliac crest when obtaining mesenchymal stem cells from bone marrow*. J Bone Joint Surg Am, 2013. **95**(12): p. 1101-7.
20. Joensuu, K., et al., *Interaction between marrow-derived human mesenchymal stem cells and peripheral blood mononuclear cells in endothelial cell differentiation*. Scand J Surg, 2011. **100**(3): p. 216-22.
21. Pytlik, R., et al., *The cultivation of human multipotent mesenchymal stromal cells in clinical grade medium for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2009. **30**(20): p. 3415-27.
22. Murphy, M.B., et al., *Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine*. Exp Mol Med, 2013. **45**: p. e54.
23. Stehlik, D., et al., *Xenogeneic protein-free cultivation of mesenchymal stromal cells - towards clinical applications*. Folia Biol (Praha), 2012. **58**(3): p. 106-14.
24. Yu, Y.Y., et al., *Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair*. Bone, 2010. **46**(3): p. 841-51.

8 Seznam publikací

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s impact factorem

Stehlík, D., R. Pytlík, H. Rychtrmocová, L. Kideryová, R. Veselá, Z. Kopečný, T. Trč a M. Trněný (2012). "Xenogeneic protein-free cultivation of mesenchymal stromal cells - towards clinical applications." *Folia Biol (Praha)* 58(3): 106-114. IF 1,000

Pytlík, R., **D. Stehlík**, T. Soukup, M. Kalbáčová, F. Rypáček, T. Trč, K. Mulinková, P. Michnová, L. Kideryová, J. Živný, P. Klener, Jr., R. Veselá, M. Trněný 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. IF 8,557

Stehlik, D., R. Pytlík, H. Rychtrmocová, R. Veselá, Z. Kopečný a T. Trč (2011). "Xenogeneic protein free cultivation of mesenchymal multipotent stromal cells." *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca* 78(6): 537-543. IF 0,388

b) bez IF

Stehlík D., R. Pytlík, Z. Kopečný, T. Trč (2009). "Použití multipotentních mezenchymových stromálních buněk ke zlepšení regenerace kostní tkáně." *Ortopedie* 2009;3: 99-102

Stehlík D., R. Pytlík, Z. Kopečný, T. Trč (2015). "Současné klinické použití MSC k regeneraci kostní tkáně." *Ortopedie* 2015, 3:

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

a) s IF -

b) bez IF

Pytlík R, T. Purkrabková, **D. Stehlík**, P. Hofman, P. Červinková, P. Obrtlíková, T. Zima, M. Trněný (2005). "Growth and differentiation of mesenchymal stem cells in human sera." *BONE MARROW TRANSPLANTATION*, 35 Suppl.: S77-S78

Stehlík D., R. Pytlík, Z. Kopečný, T. Trč (2015). "Současné klinické použití MSC v regeneraci hyalinní chrupavky." *Ortopedie* 2015, 3:

Pytlík R., O. Slanař, **D. Stehlík**, E. Matějková (2011). Kapitola 6: "Production of clinical grade mesenchymal stromal cells." str. 145-178: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*, Daniel Eberli (Editor), ISBN 978-953-307-663-8, 602 str., InTech, Chorvatsko