

Kultivace mezenchymových kmenových buněk bez xenogenních bílkovin

Xenogeneic Protein Free Cultivation of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells

D. STEHLÍK^{1,2,3}, R. PYTLÍK², H. RYCHTRMOCOVARÁ², R. VESELÁ², Z. KOPEČNÝ¹, T. TRČ¹

¹ Klinika ortopedie dětí a dospělých 2. LF-UK a FN Motol, Praha,

² 1. Interní klinika 1. LF-UK, Praha

³ Anatomický ústav, 1. LF-UK, Praha

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

The aim of this study was to compare the standard laboratory method of cultivation of mesenchymal multipotent stromal cells (MSC) and a novel technique of rapid MSC expansion focused on simple clinical use.

MATERIAL AND METHODS

Bone marrow mononuclear cells of donors were cultured for 14 days by the standard and the new cultivation method. The standard method (STD) was based on an alpha MEM medium supplemented with foetal calf serum (FCS). The new animal protein-free method (CLI) was based on the clinical grade medium Cellgro™, pooled human serum and human recombinant growth factors (EGF, PDGF-BB, M-CSF, FGF-2) supplemented with dexamethasone, insulin and ascorbic acid. The cell product was analyzed by flow cytometry. Furthermore, the cell products of STD and CLI methods were differentiated in vitro, and histochemical and immunohistochemical analyses, electron microscopy and elemental analysis were performed. Some cells were seeded on biodegradable scaffolds, in vivo implanted into immunodeficient mice for 6 weeks and evaluated by histological methods.

RESULTS

Yields of the CLI method after 14 days of cultivation were 40-fold higher than those obtained by the STD technique ($p < 0.05$). Cell products of both STD and CLI methods fulfilled the criteria of MSC in terms of antigen expression assessed by flow cytometry, as well as osteogenic, chondrogenic and adipogenic in vitro differentiation assays. Moreover, these cells seeded on three-dimensional scaffolds cultured in osteogenic medium produced mineral deposits and a fibrillar extracellular matrix seen with the electron microscope. Deposits examined by element analysis contained calcium and phosphorus at a ratio of 5 to 3, which corresponded to hydroxyapatite. The cell product seeded on biodegradable scaffolds and implanted into immunodeficient mice was able to form a bone-like calcified tissue with blood supply of mouse origin.

DISCUSSION

The currently used methods of cultivation have certain disadvantages compared to the CLI technique, such as a longer cultivation period, need of primary expansion and reseeding and use of FCS with all its potential risks. High yields of cells obtained by the CLI method in a very short time make the use of cultured cells potentially suitable for an acute trauma management. Other therapeutic non-orthotopic applications of CLI-cultured cells have to be further investigated.

CONCLUSIONS

The CLI method is unique, rapid, simple and lacking the addition of animal proteins. CLI-cultured cells fulfil the criteria of MSC. The CLI method potentially allows for closed system cultivation in good manufacturing practice (GMP) conditions. It seems to be easily transferable to good clinical practice compared to other protocols and should extend the possibilities of cell therapy and tissue engineering of cartilage and bone. The new method is protected by Czech patent 301 148 and by european patent EP 1999250 according to Czech and international laws.

Key words: cell therapy, tissue engineering, multipotent mesenchymal stromal cells, good manufacturing practice, growth factors, human serum.

ÚVOD

Tkáňové inženýrství a buněčná terapie dospělými kmenovými buňkami se nyní rychle rozvíjí v mnoha oborech medicíny včetně rekonstrukční chirurgie skeletu. Dospělé kmenové buňky jsou schopny zlepšit regeneraci poškozených tkání. Mezenchymové multipotentní stromální kmenové buňky (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, (12) získaných i vrozených kostních defektů, aseptických nekrotizací, hojení šlach, vazů, kožního krytu a také chrupavek. Počet indikací k použití MSC stále roste.

Atraktivním zdrojem buněk pro buněčnou terapii i tkáňové inženýrství (1, 3, 14) se staly MSC pro schopnost rychlého množení a diferenciaci do různých buněčných linií. MSC jsou schopné diferenciaci do kardiomyocytů, (16, 17) neurálních buněk (6, 26), beta buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu (5), adipocytů, chondrocytů (15) a v neposlední řadě osteoblastů. Vzhledem k tomu, že MSC jsou koktejem různých buněčných populací, byla Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii stanovena minimální kritéria pro MSC (7). Klinické terapeutické použití v ortopedii naráží stejně jako v ostatních oborech nejen na limitovaný počet kmenových buněk (10), ale i na různá nařízení úřadů regulujících použití moderních léčebných metod. Navzdory vylepšení odběrových technik zůstává množství izolovaných buněk nadále nízké, je příčinou selhávání technik buněčné terapie s použitím nemanipulovaných buněk a neřeší potřeby tkáňového inženýrství. V kostní dřeni se MSC vyskytují s četností menší než 1×10^{-3} jaderných buněk (25). Jako řešení se nabízí namnožení MSC in vitro. Ovšem pomnožení MSC již nesplňuje požadavek na minimální manipulaci. Pro tyto buňky byl zaveden zastřešující název přípravky pro buněčnou terapii (Human Cell-based Medicinal Produkt) a musí splňovat požadavky správné výrobní praxe (GMP) (23) (k nahlédnutí www.picschema.org), a další regulace (SÚKL, Evropské lékové agentury – EMEA – www.emea.europa.eu, např. Nařízení evropského parlamentu a rady č. 1394/2007, FDA) (9), což neznamená jen splnění přísných kritérií pro výrobní prostory, materiály, validaci, standardizaci, skladování, expedici, značení, dokumentaci a další administrativu, ale také testování bezpečnosti a efektivity jako u jakýchkoli jiných léčiv což činí zavedení kmenových buněk do běžné klinické praxe velmi finančně náročným.

Současné standardní expanzní protokoly pro MSC jsou založeny na alpha MEM mediu a fetálním telecím séru (FCS). Ačkoli FCS pro klinické použití je na trhu k dispozici, nebezpečí přenosu virových a prionových onemocnění a zvláště riziko imunitních reakcí je jeho významnou nevýhodou (20). Zohledníme-li také senescenci kmenových buněk pěstovaných v takto suplementovaných mediích, (18, 24) jeví se použití FCS jako přinejmenším méně výhodné. Tyto protokoly jsou navíc spojeny s vícečlenným pasážováním a tím i časovou náročností a zvýšeným množstvím kritických kroků ve výrobním procesu.

Naším cílem bylo nahrazení FCS v růstovém mediu lidským sérem bez použití xenogenních bílkovin. V této práci tedy ve srovnání s STD metodikou prezentujeme unikátní jednokrokový expanzní protokol dospělých kmenových buněk založený na klinicky schváleném mediu CellGroTM, lidském séru, rekombinantních lidských růstových faktorech (EGF, PDGF-BB, M-CSF, FGF-2), dexametazonu, insulinu a kyselině askorbové, se společnou kultivací adherentních a neadherentních buněk kostní krve. Tento protokol nevyužívá xenogenní proteiny a zdá se být snadno přenositelný do GMP i správné klinické praxe.

MATERIÁL A METODIKA

Mezenchymové stromální multipotentní buňky

Dárci MSC byli pacienti podstupující diagnostickou či stagingovou trepanobiopsii pro hematologické onemocnění. Odběr 10 ml kostní krve byl proveden z oblasti spina iliaca posterior superior po poskytnutí informovaného souhlasu.

Media a suplementy

Medium pro schválené pro klinické účely CellGroTM bylo zakoupeno od firmy CellGenix (Freiburg, Německo). Medium pro výzkumné účely alpha-MEM, EDTA-trypsin, glutamin, antibiotika a FCS byli zakoupeny od Gibco (Invitrogen division, Paisley, Skotsko). 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 (Víděň, Rakousko). Poolované lidské sérum (hS) bylo získáno smícháním 5 jednotek AB Rh negativní plazmy, zakoupených od Ústavu hematologie a krevní transfúze (Praha, Česká republika), rekalcifikací a filtrací přes membránu 0,22 μ m. Aliquoty byly skladovány v -80°C do doby použití.

Expanze mezenchymových stromálních multipotentních buněk

MSC byly získány kultivací mononukleárních buněk kostní krve separací na Ficollu. Buňky byly nasazovány v počtu $10^5/\text{cm}^2$ kultivační láhve (TPP, Trasadingen, Švýcarsko) a to buď do media na bázi media pro klinické použití (CLI) nebo do standardního media (STD) a kultivovány po dobu 2 týdnů za standardních podmínek (5% CO_2 , 37 °C).

STD medium obsahovalo alpha-MEM s 10% FCS, 2 mmol glutaminu, 1% penicilinu a streptomycinu. Neadherentní buňky byly odmyty po 24 hodinách a medium bylo měněno dvakrát týdně.

CLI medium bylo založeno na CellGro™ mediu a 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). V tomto případě neadherentní buňky nebyly odmyty a medium nebylo měněno po celé 2 týdny. Suplementy byly přidávány dvakrát týdně. Buňky byly po 2 týdenní kultivaci opláchnuty PBS a adherentní buňky sklizeny 0,25% EDTA s 1% trypsinem. Poté, co předběžné pokusy ukázaly rychlé vyčerpání média a odumírání buněk před 14. dnem kultivace při úvodní koncentraci 10^5 mononukleárních buněk/cm², bylo množství nasazovaných buněk sníženo na $0,33 \times 10^5$ /cm² kultivační plochy.

Stanovení počtu a antigenní analýza MSC

Počet sklizených buněk (n^{tot}) byl stanovován na Beckman-Coulter AcTdiff2 (Fullerton, Kalifornie, USA). Další specifikace byla provedena pomocí antigenních struktur na přístroji FACSCalibur (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, Kalifornie, USA). Byly použity tyto protilátky: anti-CD45 a anti-CD235a (DakoCytomation, Brno, Česká republika) a 7-AAD (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Buňky 7AAD negativní byly považovány jako viabilní. Podfrakce CD45⁺ CD235a⁺ buněk byla považována za MSC. Počet MSC byl stanoven dle vzorce:

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

Dále byla provedena průtoková cytometrie pomocí 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 biotinylation, CXCR4 PE, (R&D Systems). Dále streptavidin-PE byl zakoupen u Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo) a isotypové kontroly IgG1 FITC, IgG1 PE, IgG2b FITC, IgG2b PE and IgG1 PE-Cy5 u DakoCytomation (Brno, Česká republika). Jako buňky pozitivní pro daný antigen byly stanoveny buňky s fluorescencí větší než 99,5 % kontroly.

Stanovení diferenciační schopnosti STD a CLI pěstovaných MSC

Schopnost diferenciace STD a CLI pěstovaných MSC do osteogenní, chondrogenní a adipogenní byla stanovována za použití standardních diferenciačních medií nasazením 10^4 MSC/cm².

Osteogenní medium obsahovalo alpha MEM jako základ s 10% FCS, 10 mmol β-glycerolfosfátu, 0,5 mmol fosfátu kyseliny askorbové a 0,1 µmol dexametazonu. Po 4 týdenní kultivaci bylo provedeno von Kossovo barvení a barvení na alkalickou fosfatázu.

Chondrogenní diferenciace byla indukována alpha-MEM s 50 ng/ml TGF-β1 nebo CellGro™ mediem s FGF-2, PDGF-BB, EGF a TGF-β1 nasazením a agregací 10^6 MSC v kónických zkumavkách (Sarstedt, Nümbrecht, Německo). Mikromasy byly po 2 týdnech kultivace barveny hematoxylin-eosinem, toluidinovou modří a protilátkami proti kolagenu II.

Adipogenní diferenciace byla prováděna kultivací střídavě v indukčním a udržovacím adipogenním mediu. Indukční medium obsahovalo alpha-MEM s 10% FCS, 2 mmol glutaminu, 1% penicilinu a streptomycinu, 1 µmol dexametazonu, 0,2 mmol indomethacinu, 0,01 mg/ml insulinu a 0,5 mmol 3-isobutyl-l-methyl-xanthinu. Udržovací medium alpha-MEM s 10% FCS, 2 mmol glutaminu, 1% penicilinu a streptomycinu a 0,01 mg/ml insulinu. Medium bylo měněno dvakrát týdně. Po 4 týdenní kultivaci byly kultury barveny olejovou červení po fixaci v 70% etanolu.

Osteogenní diferenciace MSC na trojrozměrném nosiči

Nosič zkonstruovaný z vláken poly(L-lactidu) byl vyroben již dříve popsanou technologií v Institutu makromolekulární chemie Akademie věd České republiky. Tyto nosiče byly diskoidního tvaru o průměru 5,6 mm a tloušťce 2 mm. Vzdálenost mezi vlákny byla 100–400 µm. Na nosiče bylo nasazeno 2×10^5 MSC z primární expanze z CLI či STD media a dále byla prováděna kultivace v osteogenním či STD mediu 4 týdny. Nosiče byly barveny von Kossovým barvením, barvením na alkalickou fosfatázu a dále podrobeny elektronové mikroskopii a prvkové analýze (Hitachi scanning electron microscope, Fakulta chemické technologie, VŠCHT, Praha).

In vivo implantace nosičů

Nosiče byly osazeny 2×10^5 MSC z CLI nebo STA media. Nosič osazený MSC z CLI media byl nejprve pěstován 3 týdny in vitro v osteogenním mediu a poté implantován podkožně imunodeficientní myši (NOD/LtSzRag1⁻) do oblasti pravých dolních žeber. Druhostranně byl implantován nosič osazený MSC expandovaných v STD mediu jako pozitivní kontrola nebo neosazený nosič jako kontrola negativní. Pokusná zvířata byla chována v certifikovaných prostorách a byla jim podávána sterilní strava a acidifikovaná voda s cotrimoxazolem po dobu 6 týdnů. Poté byla zvířata usmrcena a fixována perfúzí 10% formaldehydem. Nosiče byly poté podrobeny histologickému vyšetření. Pokus byl v souladu s legislativou schválen ústavní komisí pro práci s laboratorními zvířaty.

Statistická analýza

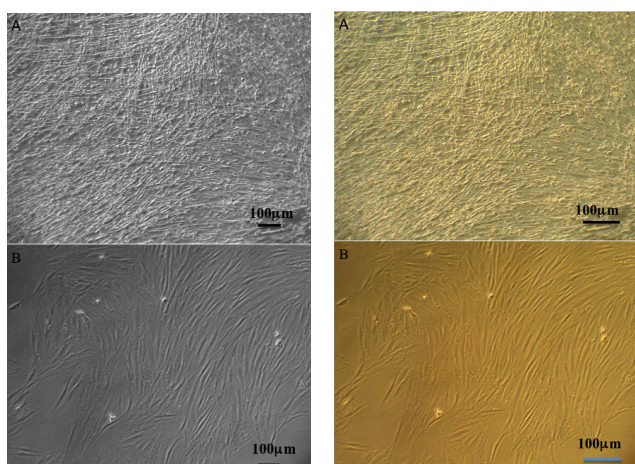
Kalkulace byly provedeny programem Statistica (StatSoft, Tulsa, OK). Normalita dat byla ověřena D'Agostino-Pearsonovým testem. Protože významné množství výsledků vykazovalo nenormální rozložení, užívali jsme neparametrické testy a výsledky byly vyjadřovány jako mediány a rozmezí. Párové vzorky byly srovnávány 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 kategoriálních proměnných byly použity Yatesův korigovaný chi-square test nebo Fischerův přesný test. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

VÝSLEDKY

Expanze MSC

Mononukleární buňky získané z kostní krve 44 dárců byly nasazeny do 75 cm² láhví v počtu $2,5 \times 10^6$ buněk na láhev (STD metodika) či $2,5 \times 10^6$ buněk na láhev (CLI metodika) a pěstovány výše popsány způsoby. Kultury byly expandovány po dobu 14 dní. Adherentní buňky nabývaly v CLI (obr. 1A) i STD (obr. 1B) kulturách typické větvenovité vzezření MSC, jak je patrné z foto-



Obr. 1. Nativní snímek kultur MSC 14. den kultivace A: CLI medium, B: STD medium.

dokumentace reprezentativních kultur téhož dárce. V CLI mediu za přítomnosti neadherentní složky byly kolonie větší a následně nabývaly vícevrstevný charakter. Neadherentní buňky se soustřeďovaly nad středem vznikajících kolonií MSC. Po kultivaci byly neadherentní buňky odmyty a adherentní buňky sklizeny, resuspendovány v odpovídajícím mediu, část buněk byla použita na analýzu a další pro diferenciační pokusy či pro kultivaci na polylaktidových nosičích in vitro a in vivo.

Stanovení počtu a antigenní analýza MSC

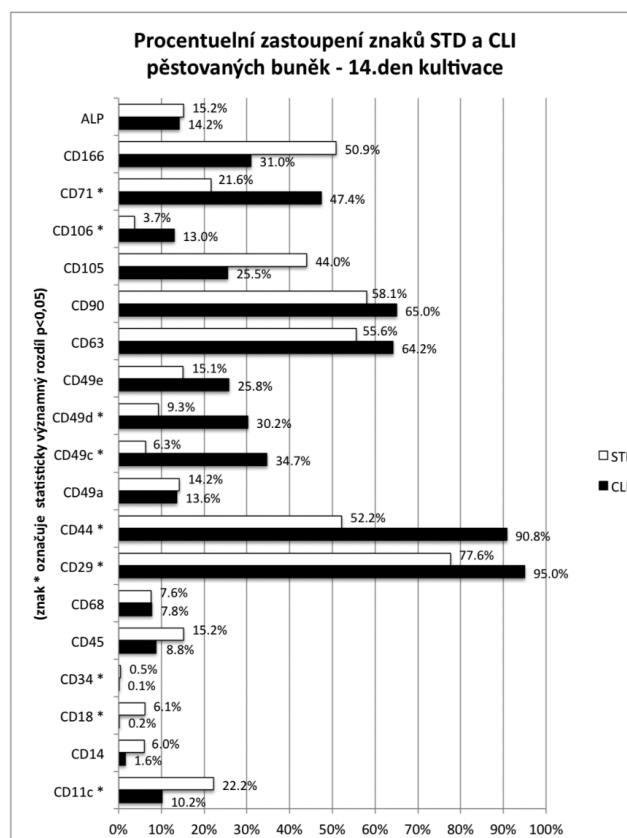
Celkové výtěžky adherentních buněk získaných CLI metodikou bylo vyšší než výtěžky získané STD metodikou (medián, $2,9 \times 10^6$ adherentních buněk v. $0,1 \times 10^6$ adherentních buněk na 10^6 nasazených mononukleárních buněk, $p < 0,0001$). Procento MSC (CD45-CD235a- buněk) bylo téměř stejné v kulturách získaných oběma metodami, zatímco procento živých buněk (7-AAD negativních) bylo větší v kulturách pěstovaných CLI metodou (tab. 1). Pro podrobnější analýzu buněčného produktu byly průtokovou cytometrií stanoveny jednak markery MSC, jednak některé diferenciační markery

Tab. 1

Srovnání výtěžků MSC pěstovaných STD a CLI metodou			
	STD (medián)	CLI (medián)	p =
Celkový počet adherentních buněk (na 10^6 nasazených mononukleárních buněk)	$0,098 \times 10^6$ ($0,02-0,24 \times 10^6$)	$2,87 \times 10^6$ ($0,44-7,18 \times 10^6$)	$<0,0001$
Procento živých (7-AAD-) buněk	73,9% (48,0-87,3%)	86,4% (77,1-96,1%)	$<0,05$
Procento MSC (CD45-CD235-)	95% (50-98%)	94% (52-99%)	NS

a adhezivní molekuly. Buňky pěstované oběma metodami exprimovaly znaky CD90, CD29, CD44 a CD105 a byly negativní pro znaky CD45, CD34 a CD14, takže splňovaly antigenní kritéria pro MSC (7). Buňky získané CLI metodikou měly statisticky významně vyšší expresi některých adhezivních molekul jako je CD29 ($\beta 1$ -integrin) CD49c, CD49d ($\alpha 3$ a $\alpha 4$ integrin) a zejména CD44 (receptor extracelulární matrix, graf 1). Rozdíl v expresi dalších MSC markerů mezi buňkami CLI a STD nenabývaly statistického významu.

Graf 1



Stanovení diferenciační schopnosti STD a CLI pěstovaných MSC

Ke stanovení diferenciačních schopností buněk získaných oběma metodami jsme kultivovali duplicitně v diferenciačních mediích buňky od 6 dárců. Buňky získané STD či CLI kultivací po 4 týdnech diferenciace v osteogenním mediu uniformně vykazovaly pozitivitu v barve-

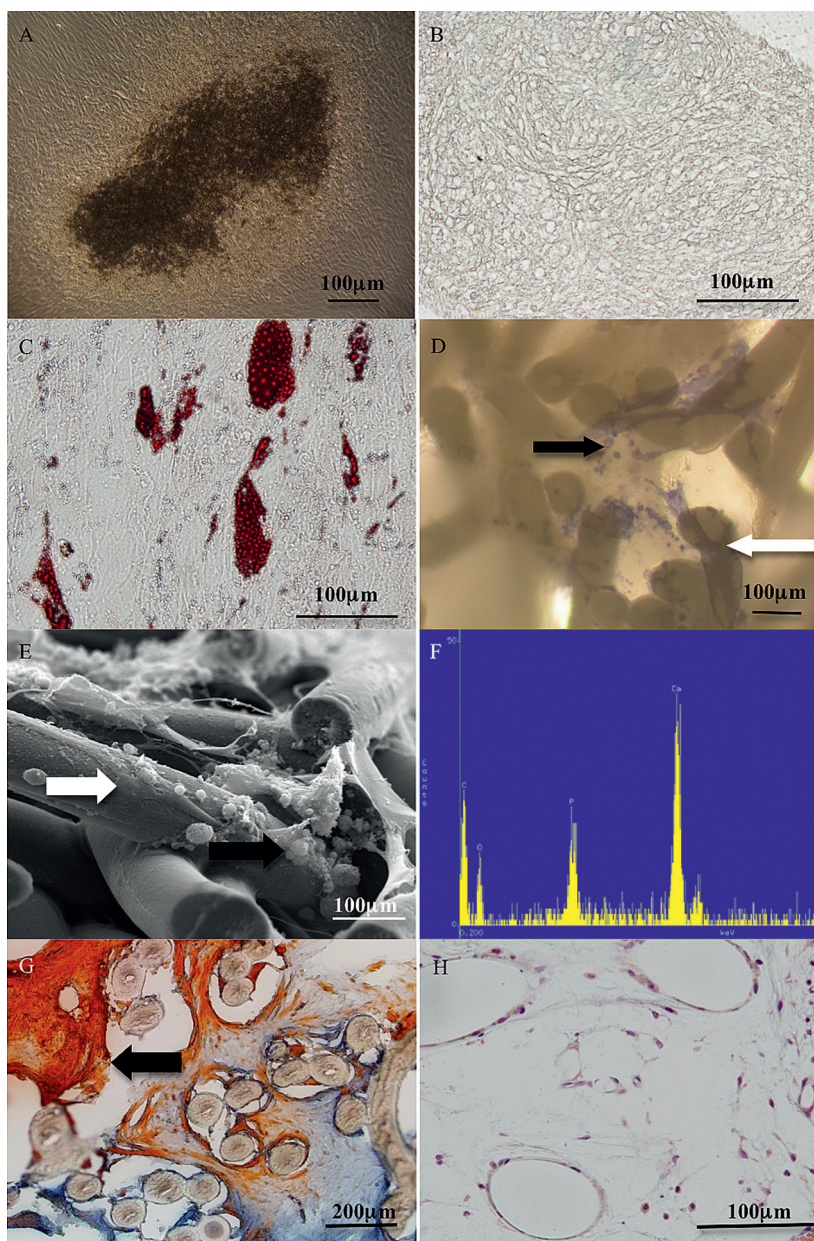
ní na alkalickou fosfatázu i ve von Kossově barvení (obr. 2A). Při chondrogenní diferenciaci buňky pěstované oběma metodami vytvářely mikromasy a získaly fenotyp podobný chondroblastům. Buňky získané CLI kultivací však vytvářely mikromasy pouze tehdy, bylo-li použito v diferenciaci rovněž CellGro™ medium s FGF-2, PDGF-BB, EGF a TGF-β1 (celkem 3 dárce). Ve všech získaných mikromasách se vytvořená extracelulární matrix barvila pozitivně alciánovou modří a protilátkami proti kolagenu typu II (obr. 2B). Všechny adipogenně diferencované kultury se po 4 týdnech barvily pozitivně olejovou červí, která potvrdila přítomnost tukových kapek. (obr. 2C) Schopností diferenciaci do tří mezodermových linií buňky splnily diferenciální kritéria ISCT pro MSC (7).

Osteogenní diferenciaci MSC na trojrozměrném nosiči in vitro a in vivo

Při kultivaci in vitro CLI i STD buněk na nosičích v osteogenním mediu (12 dárce) nebyl zaznamenán zřetelný rozdíl. Buňky po nasazení využívaly zejména místa křížení vláken nosiče a teprve později prostory mezi vlákny přemostovaly. Největší množství buněk byla přítomna na povrchu nosiče a směrem ke středu buněk ubývalo, ale byly přítomny. Po 2 týdnech byla hydroxyapatitová depozita zřetelná ve světelném mikroskopu a také se tyto buňky barvily pozitivně na alkalickou fosfatázu. (obr. 2D). Na snímcích ze skenovacího elektronového mikroskopu jsou zřetelná minerální depozita společně s vláknitou extracelulární matrix (obr. 2E). Prvková analýza depozit ukázala poměr vápníku a fosforu 5:3, což odpovídá poměru těchto elementů v hydroxyapatitu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (obr. 2F). Kromě krystalické složky je zřetelná i část vláknitá extracelulární matrix.

In vivo implantace nosičů

Nosiče s buňkami napěstovanými CLI byly implantovány 12 imunodeficientním myším (NOD/LtSz-Rag1⁻) subkutánně pravostranně, vlevo byla implantována pozitivní kontrola (buňky ze STD media, n = 6) či negativní kontrola (nosič bez buněk, n = 6). Explantace byla provedena standardně po 6 týdnech. Na histologických řezech je patrné, že buňky z CLI i STD byly schopné produkovat extracelulární matrix, která



Obr. 2. A – Osteogenní diferenciaci CLI expandovaných MSC – 4 týdny, von Kossovo barvení, B – Chondrogenní diferenciaci CLI expandovaných MSC – 2 týdny imunohistochemické barvení na kolagen II, peroxidáza, C – adipogenní diferenciaci CLI expandovaných MSC – 4 týdny, olejová červeň, D – osteogenní diferenciaci na 3D PLLA nosiči – 2 týdny, hydroxyapatitová depozita (černá šipka) zřetelná ve světelném mikroskopu, buňky barví se pozitivně na alkalickou fosfatázu (bílá šipka), E – snímek ze skenovacího 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, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, G – řez PLLA nosičem osazený CLI expandovanými buňkami po 6 týdnech in vivo implantace (NOD/LtSz-Rag1⁻ myš) kosti podobná kalcifikovaná extracelulární matrix (černá šipka) s cévním zásobením (Ladevigova modifikace Massonova modrého trichromu), H – negativní kontrola – neosazený nosič (Ladevigova modifikace Massonova modrého trichromu) je patrná nízká celularita, ojedinělé cévy a malé množství extracelulární matrix myšího původu.

kalcifikovala a vytvářela spolu s cévním zásobením kosti podobnou strukturu (obr. 2G). Na povrchu vláken nosiče se ojediněle objevila obrovskobuněčná reakce. CLI

napěstované buňky vytvářely více kalcifikované matrix než STD pěstované buňky. Na histologických řezech negativních kontrol, tedy nosičů implantovaných bez buněk (obr. 2H), je patrná nízká celularita, ojedinělé cévy a malé množství extracelulární matrix myšního původu.

DISKUSE

Spolehlivý zdroj velkého množství MSC pro terapeutické účely je stále nedorozřešenou překážkou širokého použití dospělých kmenových buněk v klinické praxi. Tato práce popisuje originální postup kultivace MSC bez zvířecích bílkovin, bez nutnosti odmytí neadherentních buněk a bez nutnosti výměny media v průběhu dvou týdnů kultivace.

Buňky kultivované námi vyvinutým způsobem splňují všechna kritéria kladená na MSC Mezinárodní společností pro buněčnou terapii (ISCT). Buňky kultivované v CLI adherují k plastu, exprimují znaky, které mají exprimovat MSC, a neexprimují znaky, které MSC exprimovat nemají, a jsou schopné diferenciací do tří mezodermových linií (7). To vše ukazuje, že tyto buňky tvoří alternativu k buňkám kultivovaným STD postupem.

Hlavní výhodou našeho kultivačního postupu je jeho rychlost. V CLI metodice není nutné pasážování buněk k dosažení dobrých výtěžků. Tím dochází ke zkrácení délky kultivace z běžných 6 týdnů na pouhých 14 dní. Takto krátká doba by v klinické praxi výrazně zlepšila a rozšířila možnosti buněčné terapie a tkáňového inženýrství muskuloskeletálního systému nejen u plánovaných výkonů, ale také při léčbě traumat.

Rychlosti kultivačního postupu bylo dle našeho názoru dosaženo třemi faktory: užitím lidského séra místo fetálního telecího séra, dále užitím růstových faktorů a cytokinů a konečně kultivací MSC společně s neadherentními krvetvornými buňkami.

Zdravotní rizika a suboptimální výsledky při užití fetálního telecího séra vedly řadu autorů k hledání alternativ, včetně bezsérového media (4). Autologní sérum je nevýhodné zejména pro omezený objem takového materiálu a použití samotného alogenního lidského séra vede k zástavě růstu a buněčné smrti (21). Konzistentních úspěchů bylo dosaženo s destičkovým lyzátem, který obsahuje rovněž některé z námi užitých cytokinů, avšak ve variabilních a předem neodhadnutelných množstvích (19).

Při výběru media, séra a suplementů jsme dbali na to, aby tyto komponenty pokud možno byly schváleny pro klinické užití. Klinicky certifikované CellGro™ for Hematopoietic Stem Cells (CellGenix) se v předběžných experimentech ukázalo jako stejně vhodné či lepší než standardní alfa-MEM medium (nepublikovaná data). Při volbě suplementů jsme vycházeli z práce Gronthosa a Simmonse (8), kteří popisovaly zlepšení výtěžků MSC při použití askorbátu, inzulínu, dexamethasonu, PDGF-BB a EGF, ale ne v souvislosti s využitím lidského séra. K této pětikombinaci byly na základě dalších výsledků (11, 22) přidány M-CSF a FGF-2, přičemž právě přidá-

ní těchto dvou suplementů vedlo k výraznému zvýšení výtěžků MSC (nepublikovaná data).

Kokultivace adherentní a neadherentní složky mononukleárních buněk z kostní krve se zdá být pro pěstování MSC prospěšná. Jejich vzájemnou komunikaci potvrzují další autoři (2). Nejenže společná kultivace neadherentních buněk stimuluje MSC k růstu, ale také odpadá jeden kritický krok kterým je při STD kultivaci nutnost separace neadherentních buněk. Navíc takto pěstované kokultury, jak jsme zjistili, nevyžadují výměnu media 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.

ZÁVĚR

V této práci jsme srovnali standardní a námi vyvinutou unikátní rychlou a jednoduchou metodu pro pěstování velkého množství mezenchymových multipotentních kmenových buněk bez potřeby primární expanze. Vlastnosti buněk se shodují s vlastnostmi MSC pěstovaných standardní laboratorní metodikou a splňují kritéria pro MSC. Základem metody je společné pěstování adherentní a neadherentní složky kostní dřeviny v mediu schváleném pro klinické použití s přidavkem lidského séra a rekombinantních růstových faktorů bez příměsi zvířecích bílkovin. Věříme, že tuto metodu bude snadné přenést do uzavřeného systému a do podmínek správné výrobní praxe a po splnění požadavků SÚKL ji bude možno užívat v klinice pro tkáňové inženýrství chrupavky a kosti. Vhodnost CLI pěstovaných MSC buněk pro další potenciální klinické aplikace, jako jsou potlačení reakce štěpu proti hostiteli (GvHD), angiologické aplikace, tkáňové inženýrství dalších orgánů a jiná místní či celotělová podání, je nutno ověřit dalšími analýzami.

Literatura

1. ABDALLAH, B. M., KASSEM, M.: The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives. *J. Cell. Physiol.*, 218: 9–12, 2009.
2. BAKSH, D., DAVIES, J. E., ZANDSTRA, P. W.: 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: 3012–3019, 2005.
3. CAPLAN, A. I.: Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.*, 213: 341–347, 2007.
4. CHASE, L. G., LAKSHMIPATHY, U., SOLCHAGA, L. A., RAO, M. S., VEMURI, M. C.: A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell. Res. Ther.*, 1: 8, 2010.
5. CHEN, L. B., JIANG, X. B., YANG, L.: Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J. Gastroenterol.*, 10: 3016–3020, 2004.
6. CHOPP, M., LI, Y.: Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol.*, 1: 92–100, 2002.

7. DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D., HORWITZ, E.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*, 8: 315–317, 2006.
8. GRONTHOS, S., SIMMONS, P. J.: The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood*, 85: 929–940, 1995.
9. HALME, D. G., KESSLER, D. A.: FDA regulation of stem-cell-based therapies. *N. Engl. J. Med.*, 355: 1730–1735, 2006.
10. HERNIGOU, P., POIGNARD, A., BEAUJEAN, F., ROUARD, H.: Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J. Bone Jt Surg.*, 87A: 1430–1437, 2005.
11. JIN-XIANG, F., XIAOFENG, S., JUN-CHUAN, Q., YAN, G., XUE-GUANG, Z.: Homing efficiency and hematopoietic reconstitution of bone marrow-derived stroma cells expanded by recombinant human macrophage-colony stimulating factor in vitro. *Exp. Hematol.*, 32: 1204–1211, 2004.
12. KITO, H., KITAKOJI, T., TSUCHIYA, H., KATO, M., ISHIGURO, N.: 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: 629–634, 2007.
13. KUBIES, D., RYPACEK, F., KOVAROVA, J., LEDNICKY, F.: Microdomain structure in polylactide-block-poly(ethylene oxide) copolymer films. *Biomaterials*, 21: 529–536, 2000.
14. KUČERA, T., URBAN, K., SOUKUP, T.: Hojení kostních defektů. *Ortopedie*, 3: 226–231, 2009.
15. MACKAY, A. M., BECK, S. C., MURPHY, J. M., BARRY, F. P., CHICHESTER, C. O., PITTENGER, M. F.: Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.*, 4: 415–428, 1998.
16. MAKINO, S., FUKUDA, K., MIYOSHI, S., KONISHI, F., KODAMA, H., PAN, J., SANO, M., TAKAHASHI, T., HORI, S., ABE, H., HATA, J., UMEZAWA, A., OGAWA, S.: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J. Clin. Invest.*, 103: 697–705, 1999.
17. PROCKOP, D. J.: Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science*, 276: 71–74, 1997.
18. SCHALLMOSER, K., BARTMANN, C., ROHDE, E., BORK, S., GUELLY, C., OBENAUF, A. C., REINISCH, A., HORN, P., HO, A. D., STRUNK, D., WAGNER, W.: Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica*, 2010.
19. SCHALLMOSER, K., BARTMANN, C., ROHDE, E., REINISCH, A., KASHOFER, K., STADELMEYER, E., DREXLER, C., LANZ, G., LINKESCH, W., STRUNK, D.: Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*, 47: 1436–1446, 2007.
20. SELVAGGI, T. A., WALKER, R. E., FLEISHER, T. A.: Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood*, 89: 776–779, 1997.
21. SHAHDADFAR, A., FRONSDAL, K., HAUG, T., REINHOLT, F. P., BRINCHMANN, J. E.: In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cell.*, 23: 1357–1366, 2005.
22. TSUTSUMI, S., SHIMAZU, A., MIYAZAKI, K., PAN, H., KOIKE, C., YOSHIDA, E., TAKAGISHI, K., KATO, Y.: Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288: 413–419, 2001.
23. UNGER, C., SKOTTMAN, H., BLOMBERG, P., DILBER, M. S., HOVATTA, O.: Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. *Hum. Mol. Genet.*, 17: R48–53, 2008.
24. WAGNER, W., BORK, S., HORN, P., KRUNIC, D., WALENDA, T., DIEHLMANN, A., BENES, V., BLAKE, J., HUBER, F. X., ECKSTEIN, V., BOUKAMP, P., HO, A. D.: Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One*, 4: e5846, 2009.
25. WERNITZ, J. R., LANE, J. M., BURSTEIN, A. H., JUSTIN, R., KLEIN, R., TOMIN, E.: Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *J. Orthop. Res.*, 14: 85–93, 1996.
26. ZHAO, L. R., DUAN, W. M., REYES, M., KEENE, C. D., VERFAILLIE, C. M., LOW, W. C.: Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp. Neurol.*, 174: 11–20, 2002.

Poděkování

Poděkování patří Doc. Václavu Hulínskému za provedení prvkové analýzy. Popsaná nová metodika je chráněna českým patentem 301 148 a evropským patentem EP 1999250 dle Českého a mezinárodního práva.

Korespondující autor:

MUDr. David Stehlík

Klinika ortopedie dětí a dospělých 2. LF UK a FN Motol
V Úvalu 84, 156 00 Praha 5

E-mail: stehlikd@seznam.cz