

# Umnažanje ljudskih mezenhimskih matičnih stanica in vitro u prisustvu lizata trombcita

---

Klanfar, Tomislav

Master's thesis / Diplomski rad

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:616081>

Rights / Prava: [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Tomislav Klanfar

**UMNAŽANJE LJUDSKIH MEZENHIMSKIH MATIČNIH STANICA IN  
VITRO U PRISUSVU LIZATA TROMBOCITA**

Diplomski rad

Zagreb, 2010. godina

Ovaj rad, izrađen u Zavodu za transfuzijsku medicinu i stanicu terapiju KBC Zagreb, pod vodstvom dr. sc. Mirne Golemović, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Zahvaljujem se mentorici diplomskog rada dr. sc. Mirni Golemovi na strpljenju, organizaciji i vodenju izrade ovog diplomskog rada, dipl. ing. Marijani Škifi na pomoći i savjetima pri izvedbi eksperimentalnih dijelova rada, te ostalom osoblju Zavoda za transfuzijsku medicinu i stanicu tarapiju KBC-a Rebro.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveu ilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matemati ki fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## UMNAŽANJE LJUDSKIH MEZENHIMSKIH MATI NIH STANICA IN VITRO U PRISUSTVU LIZATA TROMBCITA

Tomislav Klanfar

Prirodoslovno-matemati ki fakultet, Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Mezenhimske mati ne stanice (MMS) su nekrvotvorne mltipotentne mati ne stanice koje su od svih njihovih tkivnih izvora najzastupljenije u koštanoj srži (KS). MMS ispoljavaju imunomodulatorna svojstva *in vitro* što im daje potencijalnu primjenu u stani noj terapiji. MMS su klini ki primjenjivne pri transplantacijama krvotornih mati nih stanica i lije enju reacije pesatka-protiv-primatelja. U estalost MMS u KS vrlo je mala te ih je za potrebe klini ke primjene neophodno umnožiti *ex vivo*. Mi smo umnažali MMS *in vitro* u kultivacijskom mediju koji je bio oplemenjen s 10% ljudskog lizata trombocita (LT) tako izbjegavajući upotrebu suplemenata životinjskog podrijetla. MMS su bile izolirane iz KS zdravih dobrovoljnih davatelja i uspješno uzgojene u mediju oplemenjenim s LT. Tijekom cijelog perioda uzgoja *in vitro*, stanice su ispoljavale mezenhimske karakteristike; prihva ale su se na plast nu podlogu, imalevrenasti fibroblastni oblik, ispoljavale imunofenotip mezenhimskih stanica i formirale fibroblastne kolonije. Ovi nalazi daju uporište za daljnja ispitivanja upotrebe LT u postupcima umnažanja MMS.

(32 stranice, 7 slika, 3 tablice, 10 literarnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Klju ne rije i: mezenhimske mati ne stanice, lizat trombocita, koštana srž

Voditelj: dr.sc. Mirna Golemovi , znanstveni suradnik

Suvoditelj: dr.sc. Nada Oršoli , prof.

Ocenitelji: dr.sc. Mirna Golemovi , dr.sc. Nada Oršoli , prof., dr.sc. Maja Matuli , doc., dr.sc. Perica Mustafi , doc., dr.sc. Zoran Tadi , doc.

Rad prihva en: 30.lipnja 2010.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **EXPANSION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS IN PLATELET LYSATE-CONTAINING MEDIUM**

Tomislav Klanfar

Faculty of Science, Division of Biology, Department of Animal Physiology,  
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Mesenchymal stem cells (MSCs) are nonhematopoietic multipotent stem cells mainly residing in the bone marrow (BM). MSCs show immunomodulatory properties *in vitro* that make them interesting in the field of cellular therapy. MSCs have been clinically applied to improve engraftment in hematopoietic stem cell transplantation and to treat acute graft versus host disease. Incidence of MSCs in BM is very low and *ex vivo* expansion of MSCs is necessary. We expanded MSCs *in vitro* in media supplemented with 10% human platelet lysate (PL) thus avoiding standard use of animal origin supplements. MSCs isolated from BM samples of healthy donors were successfully cultured in medium containing PL. During propagation period of 35 days, MSCs continuously expressed mesenchymal characteristics: they adhered to plastic surface showing typical fibroblastoid shape, they expressed mesenchymal immunophenotype and formed fibroblast colonies. These findings give basis for further efforts in evaluating use of PL in MSCs expansion methods.

(32 pages, 7 figures, 3 tables, 10 references, original in: croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: mesenchymal stem cells, platelet lysate, bone marrow

Supervisor: Mirna Golemovic, PhD

Co-Supervisor: dr. Nada Orsolic, Prof.,

Reviewers: Mirna Golemovic, PhD., dr. Nada Orsolic, Prof., dr. Maja Matulic, Asst. Prof., dr. Perica Mustafic, Asst. Prof., dr. Zoran Tadic, Asst. Prof.

Thesis accepted: June 30 2010

## **Popis kratica**

- bFGF.....fibroblastni faktor rasta
- CD.....stani ni biljeg
- CFU-F.....test klonogenog potencijala MMS
- DD.....dobrovoljni davatelj
- EDTA.....etilendiamintetraoctena kiselina
- EGF.....epidermalni imbenik rasta
- FGS.....fetalni gove i serum
- FITC.....fluorescein-izotiocijanat
- FL.....fluorescencija
- GvHD.....reakcija presatka-protiv-primatelja
- IGF.....inzulinski imbenik rasta
- KMS.....krvotvorne mati ne stanice
- KS.....koštana srž
- LT.....lizat ljudskih trombocita
- MMS.....mezenhimske mati ne stanice
- MNS.....mononuklearne stanice
- PBS.....fiziološka otopina puferirana fosfatima
- PDGF.....trombocitni imbenik rasta
- PE.....fikoeritrin
- TGF- .....,transformiraju i imbenik rasta

## **SADRŽAJ**

1. UVOD	1
1.1. Opšte značajke mezenhimskih matinih stanica	2
1.1.1. Morfologija	3
1.1.2. Imunofenotip	4
1.2. Klinička primjena mezenhimskih matinih stanica	4
1.2.1. Imunološka terapija	4
1.2.2. Regenerativna terapija	5
1.2.3. Genska terapija	5
1.3. Kultura mezenhimskih matinih stanica <i>in vitro</i>	5
1.3.1. Uvjeti stanične kulture <i>in vitro</i>	5
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	8
3. MATERIJAL I METODE	10
3.1. Stanični uzorci i reagencije	11
3.1.1. Uzorci koštane srži	11
3.1.2. Reagencije	11
3.1.2.1. Lizat trombocita	11
3.1.2.2. Priprema kultivacijskog medija	11
3.2. Priprema stanične suspenzije iz uzorka koštane srži	12
3.2.1. Određivanje broja i vijabilnosti stanica u pripremljenim staničnim suspenzijama	12
3.2.2. Nasredovanje stanica u kultivacijske flaskove	13
3.2.3. Promjena medija	13
3.2.4. Tripsinizacija	14
3.3. Test klonogenog potencijala mezenhimskih matinih stanica	14
3.3.1. Postavljanje testa klonogenog potencijala mezenhimskih matinih stanica	14
3.3.2. Kontrastno bojanje kolonija	15
3.4. Imunofenotipizacija	16
3.5. Obrada podataka	16
4. REZULTATI	18
4.1. Dobrovoljni davatelji koštane srži	19
4.2. Morfologija mezenhimskih matinih stanica	19
4.3. Analiza rasta mezenhimskih matinih stanica	20
4.4. Klonogeni potencijal mezenhimskih matinih stanica	21

4.5. Imunofenotip uzgojenih mezenhimskih mati nih stanica <i>in vitro</i>	23
5. RASPRAVA	25
6. ZAKLJU AK	28
7. LITERATURA	30

## **1. UVOD**

Glavne značajke mati nih stanica su sposobnost održavanja ravnoteže između samoobnavljanja i diferencijacije, svojstvo plastičnosti te sposobnost svaranja velikog broja stanica specijaliziranih za određenu funkciju (1,3). Postnatalne mati nih stanice otkrivene su u mnogim organima gdje služe kao izvor novih tkivno specijaliziranih stanica kćeri. U koštanoj srži nalaze se tri vrste postnatalnih mati nih stanica; krvotvorna, mezenhimska i endotelna mati nih stanica (1). Sva tri tipa mati nih stanica predstavljaju multipotentne mati nih stanice koje daju specijalizirano stanično potomstvo. Tako krvotvorna mati nih stanica daje potomstvo stanica svih krvnih loza, endotelna mati nih stanica stanično potomstvo koje sudjeluje u izgradnji krvožilnog sustava dok mezenhimska mati nih stanica (MMS) sudjeluje u izgradnji strome koštane srži koja tvori mikrookruženje za krvotvorne mati nih stanice (1,3). Dakle, mezenhimske mati nih stanice (MMS) zajedno sa svojim staničnim derivatima i nekrvotvorni odjeljak strome.

Interes za istraživanja MMS iz koštane srži zapravo je zapažanjima A. Friedensteinom koji je prvi opisao da koštana srž sadrži adherentne, fibroblastne stanice koje su sposobne diferencirati u stanice osteogenog fenotipa (1,2,4). Te stanice je nadalje definirao u uvjetima *in vitro* kao stanice koje su sposobne proliferirati i diferencirati u kulturi *in vitro*, i to ne samo u osteocite, već i u hondrocite i adipocyte. Obzirom da su te stromalne stanice imale sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije u barem tri različita tkivna odjeljka, zadovoljile su sve kriterije da ih se prozove „mati nih stanica“. Ranih 1990-tih istraživanja MMS doživljavaju pravi procvat, pogotovo u području njihove potencijalne primjene u staničnoj terapiji.

### 1.1. Opće značajke mezenhimskih mati nih stanica-a

Mezenhimske mati nih stanice imaju sposobnost prihvatanja za plastičnu površinu, izražavaju specifične površinske antigene i u specifičnim uvjetima rasta *in vitro* ispoljavaju sposobnost diferencijacije u barem tri stanične loze (osteoblasti, chondroblasti i adipociti) (2,5,6).

Izvori mezenhimskih mati nih stanica mogu biti različiti. MMS se mogu izolirati iz koštane srži (KS), krvi iz pupkovine, periferne krvi, masnog tkiva, kosti, mišića, hrskavice, jetre, kože, slezene, timi ne žlijezde, amniotske tekućine i placente (1,3,5). Iako se sve te MMS međusobno razlikuju, bilo morfološki i/ili fenotipski sve one u određenim uvjetima uzgoja *in vitro* pokazuju svojstva tipičnih MMS.

Ipak, stroma koštane srži u svojoj heterogenoj populaciji nekrvotvornih stanica sadrži MMS koje su najdostupnije i najpogodnije za izolaciju i uzgoj *in vitro*. Te stanice se mogu uzgajati

bez posebnih dodatnih suplemenata kao što je to slučaj kod uzgoja MMS iz drugih tkivnih izvora.

MMS na svojoj površini ispoljavaju mnoge receptore za kemokine te je to jedan od mehanizama kako MMS mogu djelovati na specifičnim mjestima gdje je njihova aktivnost potrebna. Ta su mjesta prije svega ona na kojima je došlo do ozlijede kao i mjesta razvoja tumora (3).

MMS ne izražavaju kostimulatorne molekule na svojoj površini pa stoga niti ne mogu djelovati kao antigen-prezentirajuće stanice (1). To njihovo svojstvo te opažanja da u miješanoj reakciji limfocita snizuju T-stani ni odgovor (3) čini MMS vrlo interesantnima u području kliničke transplantacije. Pri alogenim transplantacijama koštane srži mogu a je pojava reakcije presatka-protiv-primatelja (*engl. graft vs. host disease; GvHD*) koja ponekada može imati i fatalan ishod po primatelja. U takvim situacijama ko-transplantacija MMS i njihov imunomodulatoran u inak mogu ublažiti simptome i eventualno riješiti GvHD (3,9). S obzirom da MMS nalaze svoju primjenu u mnogim patološkim stanjima kojima je podloga jaka imunološka reakcija, ovo je samo jedan od primjera njihove kliničke primjene,. Sva navedena svojstva MMS su vrlo primjenjivima u raznim oblicima stanica ne terapije.

### 1.1.1. Morfologija

MMS u kulturi stanica *in vitro* prilikom prihvatanja na plasti su podlogu razvijaju vretenasti fibroblastni izgled.

Prilikom izvođenja CFU-F testa (*engl. colony forming unit-fibroblastoid*) koji se izvodi u svrhu ispitivanja klonogenog potencijala MMS, može se makroskopski primjetiti dvije vrste kolonija (1). Ta se razlika odaje u veličini rastućih kolonija, a neposredno ovisi o morfologiji stanica koje sa injavaju pojedine kolonije.

Tip I MMS kolonije sa injavaju monocitni fibroblasti vretenastog izgleda koji u kulturi *in vitro* rastu brzo, imaju veliki potencijal samoobnavljanja i diferencijacije te predstavljaju najnediferenciranije MMS (1). Tip II MMS kolonija sa injavaju morfološki veće i šire stanice koje se dijele sporije (1). Nakon nekoliko presaćivanja, prvotno predominantne stanice tipa I sve su rjeđe te se omjer stanica tipa I i II mijenja u korist stanica tipa II. Vjeruje se da tip II nastaje iz MMS tipa I asimetričnom stanicnom diobom te se u povoljnim kultivacijskim uvjetima *in vitro* njihove osnovne značajke mogu dokazati i nakon 20-25 presaćivanja.

### **1.1.2. Imunofenotip**

MMS nemaju neke sebi svojstvene površinske biljege koji bi ih jednozna no razlikovali od drugih sli nih stanica te se tek kombinacijom više biljega može zaklju iti o tome da se radi o imunofenotipu MMS.

Sve MMS, bez obzira na njihovo podrijetlo, ne izražavaju biljege krvotvornih stanica poput CD34, CD14, CD11b, CD43, CD45, CD19, i HLA klasu II antigene, a izražavaju CD44, CD73, CD90, CD105, HLA klasu I antigene, PDGF i EGF receptor (1,3,5,6,9). Izražaj navedenih biljega na stanicama uzgojenim u kulturi stanica *in vitro* utvr uju se metodom proto ne citometrije. Izražaj površinskih biljega MMS vrlo je varijabilan te tako er u mnogome ovisi o starosti stanica (1,3), tj. kroz koliko u ciklusa presa ivanja prošle, jer nakon odre enog vremena neminovno dolazi do promjene morfologije, imunofenotipa i klonogenog potencijala uzgajanih MMS *in vitro* (1).

Na izražaj površinskih biljega i stoga nemogu nost njihove jednozna ne identifikacije uvelike utje u tkivni izvor iz kojeg su izolirane MMS i zna ajke samog donora (prije svega njegova dob i zdravstveni status) (1,3).

## **1.2. Klini ka primjena mezenhimskih mati nih stanica**

Navedena imunomodulatorna svojstva MMS, mogu nost jednostavne izolacije i uzgoja *in vitro* ine MMS pogodnima za klini ku primjenu

Iz dosadašnjih saznanja vidljivo je da je lokalna ili sustavna primjena MMS potencijalno mogu a u više raznih terapijskih disciplina poput regenerativne medicine, imunološke terapije i genske terapije (1,3).

### **1.2.1. Imunološka terapija**

Do sada se najviše iskustva sakupilo u lije enju pacijenata kojima su transplantirane krvotvorne mati ne stanice (KMS). MMS u ko-kulturi s KMS mogu pospješiti efikasnost njihova rasta *in vitro* (3). Naj eš i na in klini ke primjene MMS je ko-transplantacija s KMS (3). U takvim uvjetima svojom aktivnoš u MMS mogu stvoriti povoljne uvjete za prihva anje KMS i uspješnost repopulacije krvotvornog/imunološkog sustava primatelja. Osim toga prilikom alogene transplantacije KMS, MMS svojim imunomodulatornim svojstvima i lu enjem protu-upalnih citokina sprje avaju razvoj reakcije presatka-protiv-primatelja (GvHD).

### 1.2.2. Regenerativna terapija

Svojstvo MMS da se nakupljaju i proliferiraju u mjestima ozljeda gdje se aktivnoš u i diferencijacijom MMS ponovno uspostavlja tkivna i organska cjelovitost, u inilo ih je interesantnim za podru je regenerativne terapije.

I sama transplantacija koštane srži u pacijenata koji su prošli kroz opetovane cikluse citotoksi nih terapija zra enjem i kemoterapijom primjer je regeneracije koštane srži kojoj je svim tim postupcima prethodno tesko narušena funkcija (1,3).

Lokalna primjena MMS tako er se pokazala uspješna u lije enju i regeneraciji kostiju, hrskvice i ligamenata (1), što je bazirano na multipotentnim svojstvima MMS. Tako er MMS nalaze svoju primjenu, za sada još uvijek u eksperimentalnim zahvatima, u lije enju infarkta sr anog miši a te u lije enju nekih autoimunih bolesti.

### 1.2.3. Genska terapija

Svojstvo MMS da djeluju imunomodulatorno i da se mobiliziraju u mesta ozljede ini ih potencijalno iskoristive kao stanice-nosa e koji sudjeluju u ispostavi djelotvornih lijekova ili izmjenjenog genetskog materijala na ciljano mjesto (1,3). Dokazno je da takve promijenjene MMS i u *in vitro* i *in vivo* modelima mogu producirati razne proteine kroz odre eno vrijeme. Ovaj model nalazi mogu u primjenu u lije enju naslijednih bolesti i novonastalih oboljenja (1).

## 1.3. Kultura mezenhimske mati nih stanica *in vitro*

### 1.3.1. Uvjeti stani ne kulture *in vitro*

Zastupljenost MMS u koštanoj srži je 2-5 MMS u  $10^6$  mononuklearnih stanica (MNS) (1). Za primjenu MMS u terapijske svrhe, iz dosadašnjih iskustava se zaklju ilo da je potrebno transplantirati  $2 \times 10^6$  MMS po kilogramu primatelja (2). Iz navedenog je o ito da je MMS neophodno umnožiti *in vitro* kako bi u inkovito izvršile svoju funkciju prilikom transplantacije. Stoga je klju no kreirati protokol umnažanja MMS *in vitro* koji bi omogu io njihovo kvalitetno umnažanje u što kra em vremenu, a da umnožene MMS zadrže sva svojstva neophodna za njihov klini ki u inak.

Do sada se naj eše u kultivacijskim medijima s niskim sadržajem glukoze koristio fetalni gove i serum (FGS) kao izvor brojnih imbenika za rast i proliferaciju stanica. Tijekom vremena mnogi stručnjaci koji se bave umnažanjem MMS *in vitro*, optimizirali su na različite načine uvjete njihova uzgoja pa danas još uvijek vlada prilično šarenilo vezano uz protokole umnažanja u različitim institucijama diljem svijeta i konsenzus po tom pitanju još uvijek nije uspostavljen.

S pomoću testa CFU-F moguće je pratiti klonogeni potencijal MMS uzgojenih u različitim uzgojnim uvjetima. Danas se zna da se među imbenike koji mogu znatno utjecati na proliferativni kapacitet MMS *in vitro*, svakako ubrajaju trombocitni imbenik rasta (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB), epidermalni imbenik rasta (epidermal growth factor, EGF), fibroblastni imbenik rasta (basic fibroblast growth factor, bFGF), transformirajući imbenik rasta (transforming growth factor  $\alpha$ , TGF- $\alpha$ ) i inzulinski imbenik rasta (insulin-like growth factor, IGF) (1,3). S obzirom da MMS o kojima govorimo nisu imortalizirane stanice, nakon nekog vremena u kulturi *in vitro* dolazi do znatnog usporavanja rasta pretežno morfološkim promjenama stanica, pojavom stvaranju stresnih vlakana i skraćivanjem telomera izazvanih replikativnim starenjem (3) te je optimizacija kulture stanica *in vitro* neophodna u svakoj instituciji/laboratoriju u kojem se one uzgajaju.

Ključan imbenik u optimizaciji uvjeta kulture *in vitro* jest izbor animalnog seruma koji je glavni izvor imbenika rasta stanica (aminokiseline, minerali, lipidi, transportni proteini, imbenici rasta, hormoni, vitamini, inhibitori proteaza itd.). Uz to serum u kulturi djeluje i kao pH puffer (1). No, zbog nestandardizacije serijskih uzoraka FGS (*engl. lot*) dodavanje raznih imbenika rasta u medij nije se pokazalo kao pouzdan način standardizacije i optimizacije uvjeta rasta stanica. Sve su to razlozi koju su na kraju rezultirali idejom da se kreiraju uvjeti rasta u kojima će se izbjegi dodatak FGS. Kako se i ovom problemu pristupalo s više strana, tako su i tu dobiveni različiti rezultati, dijelom i zbog korištenih serumskih komponenti kao što je BSA ili visokih koncentracija imbenika rasta korištenih u eksperimentima (1). Stoga se s vremenom odustalo od te ideje i u većini slučajeva se ostalo pri upotrebi FGS.

Iako je rast MMS u uvjetima koji sadrže FGS većinom zadovoljavajući, klinička primjena tako proizvedenih MMS je dodatno upitna. Glavni problem predstavljaju već spomenuti nestandardizirani serijski uzorci FGS te s time povezana razlika u efikasnosti *in vitro* umnažanja što je rezultiralo i potrebom za većim uzorkom koštane srži kako bi se dobila zadovoljavajuća količina MMS potrebnih za transplantaciju. No najveći problem kod upotrebe FGS pri umnažanju stanica koje bi se koristile za kliničku primjenu jest njegovo

animalno podrijetlo koje predstavlja realnu opasnost od mogućeg prijenosa prionskih bolesti (3,5).

Iz svih navedenih razloga javila se velika potreba za nalaženjem odgovarajuće zamjene za FGS. U novije vrijeme postalo se ispitivati uvjete kulture MMS *in vitro* u kojima se kao nadomjestak za FGS dodaje lizat ljudskih trombocita (LT) (4,5). Prvi rezultati su se pokazali vrlo dobrima. Rast MMS u mediju s LT je davao usporedive, a ponekad i puno bolje rezultate nego u mediju s FGS (4). LT predstavlja potencijalno dobru zamjenu za FGS prilikom umnažanja MMS za kliničku primjenu i stoga se smatra vrijednim truda dodatno istražiti njegov učinak na rast MMS u kulturi *in vitro*.

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovoga rada bio je provjeriti klonogeni potencijal MMS uzgojenih u kultivacijskom mediju oplemenjenom s 10% lizata ljudskih trombocita te pratiti neke od njihovih značajki poput imunofenotipa, tijekom ranih preselivanja koja su ključna za kliničko umnažanje MMS *in vitro*.

### **3. MATERIJALI I METODE**

## **3.1. Stani ni uzorci i reagencije**

### **3.1.1. Uzorci koštane srži**

Korišteni su uzorci koštane srži (KS) od 3 zdrava davatelja koji su dali informirani pristanak za doniranje malog volumena KS za istraživanje. Centrifugiranjem u gradijentu gusto e fikola (Amersham BioSci, Velika Britanija) iz uzorka KS izdvojen je me usloj mononuklearnih stanica (MNS), koji je potom korišten za potrebe uzgoja MMS *in vitro*.

Ovi zahvati vezani uz pripremu i doradu uzoraka te kulturu stanica *in vitro* podrazumijevali su rad u sterilnim uvjetima korištenjem sigurnosnog mikrobiološkog kabineta klase II a (Heraeus KSP15, Njema ka).

### **3.1.2. Reagencije**

#### **3.1.2.1. Lizat trombocita**

Pripravci trombocita dobrovoljnih davatelja krvi prikupljeni i pripremljeni u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu korišteni su za pripremu lizata trombocita (LT). LT se koristio kao dodatak hranjivom mediju korištenom za uzgoj MMS. LT pripravljan je tako da se vre ica s trombocitima pohranila na temperaturi od -30°C. Potom se zamrznuti sadržaj naglo otopio u vodenoj kupelji (37°C) prilikom ega su se trombociti raspali i ispustili stani ni sadržaj. Takav LT se potom centrifugirao na 2300rpm /RT/30 min. Nadatalog se rasto io u sterilne polistirenske epruvete (TPP, Švicarska) i alikvoti smrznuli i pohranili na -80°C.

#### **3.1.2.2. Priprema kultivacijskog medija**

Potrebni broj alikvota LT otopio se u vodenoj kupelji (WB-4 MS, Latvija) te se centrifugirao (Heraeus Omnipuge 2.0RS, Njema ka) na 3000 rpm/10 min. U sigurnosnom mikrobiološkom kabinetu, sterilnom špricom se izdvojio nadatalog iz centrifugiranog sadržaja i profiltrirao kroz filter za šprice veli ine pora 0,22µm (TPP, Švicarska).

Kultivacijski medij sastojao se od heparina (2 IU/ml), 1% Penicilin/Streptomycin otopine (PenStrep; Sigma, Njema ka), 2 mM L- glutamina (L-glu; Sigma, Njema ka) i 10% LT.

## 3.2. Priprema stani ne suspenzije iz uzoraka koštane srži

### 3.2.1. Određivanje broja i vijabilnosti stanica u pripremljenim stani ne suspenzijama

Kako bi se odredio optimalan broj MNS/MMS za našu ivanje i umnažanje MMS, potrebno je izračunati ukupan broj stanica u uzorku te odrediti njihovu vijabilnost (postotak živih stanica). Dobiveni rezultati koriste se u dalnjim postupcima ovog istraživanja.

Ista i suha Bürker-Türkova komorica s pokrovnim stakalcem o istila se alkoholom i osušila stani evinom. Pokrovnom stakalcu navlažio se rub i postavilo ga se na sredinu komorice. Lagano ga se povlačilo iznad područja za brojanje dok se nisu pojavili krugovi interferencije (Newtonovi krugovi) koji su ukazivali da je stakalce pravilno postavljeni.

Mali volumen stani ne suspenzije izdvojio se sterilno u sigurnosnom kabinetu za potrebe brojanja pod svjetlosnim mikroskopom. Jednaki volumen stani ne suspenzije i tripanskog modrila (Fluka, Njemačka) se pomiješao i pipetom prenjeo u komoricu za brojanje. Na istu su se pripremila i mješavina stani ne suspenzije i Türkove otopine (Kemika, Hrvatska) koja se prenijela u drugi dio komorice.

Bürker-Türkova komorica se namjestila na stoli svjetlosnog mikroskopa (Olympus CX31, Japan), a stanice su se brojale pod povećanjem od 40x. Prvo su se brojale stanice obojene tripanskim modriliom tako da ih se prebrojalo u barem 2 velika kvadrata (svaki sa po 16 manjih polja) ili više od 100 stanica. Posebno su se bilježile žive (prozirne) i mrtve (plavo obojane) stanice.

Izračunao se postotak živih stanica (vijabilnost = Vi) prema formuli:

$$Vi = \text{broj živih stanica} / \text{ukupan broj stanica} \times 100$$

Zatim su se brojale stanice pomiješane s Türkovom otopinom tako da ih se prebrojalo u sva 4 kvadrata (svaki sa po 16 manjih polja). Broj stanica izražen u milijunima stanica po 1 ml stani ne suspenzije dobio se prema formuli:

$$St = \text{Broj prebrojanih stanica na } N \text{ polja} / N \times 2 \times 250 \times 1000$$

Broj vijabilnih stanica u 1 ml stani ne suspenzije (Cvi) izračunao se po formuli:

$$Cvi = St \times Vi$$

Ukupan broj vijabilnih stanica u ukupnom volumenu stan ne suspenzije izračunao se po formuli:

$$\text{Uk. br st.} = Cvi \times \text{Volumen suspenzije}$$

Ovisno o dalnjem zahvatu na stani nom uzorku, koncentracija stanica mogla se podešavati dodavanjem kultivacijskog medija.

### 3.2.2. Nasa ivanje stanica u kultivacijske flaskove

U kultivacijske flaskove (TPP, Švicarska) nasa ivale su se MNS u koncentraciji između 0,1- $0,16 \times 10^6/\text{cm}^2$ . Stanice su se nasa ivale u flaskove površine  $25 \text{ cm}^2$ . Izrađena koncentracija stanica podešila se tako da se željeni broj stanica resuspendirao u ukupno 6 ml kultivacijskog medija, što je količina koja se nasa ivala u flask površine  $25\text{cm}^2$ . Tako pripremljena stani na suspenziju u kultivacijskom mediju prenijela se u flask pomoću sterilne serološke pipete.

Kultivacijski flask morao je biti prethodno označen imenom dobrovoljnog davatelja, gusto om nasada stanica po  $\text{cm}^2$  i datumom. Prije prijenosa flaskova u  $\text{CO}_2$  inkubator dno mu se prebrisalo sterilnom kompresom namenjenom dezinficijensom (Incidin Foam, Ecolab, Njemačka).

Flask s uzorkom je prenese u  $\text{CO}_2$  inkubator (HeraCell 150, Njemačka) u atmosferu s 5%  $\text{CO}_2$  na  $37^\circ\text{C}$ .

### 3.2.3. Promjena medija

Nakon 2 dana kultivacije pri gore navedenim uvjetima, uklonio se sav kultivacijski medij s neadheriranim stanicama.

Iz  $\text{CO}_2$  inkubatora izvadio se flask te se pod invertnim mikroskopom provjerilo da li su se MNS adherirale. U sigurnosnom kabinetu, upotrebom serološke pipete izvukao se sav kultivacijski medij. Preostalom adheriranom sloju MNS dodalo se serološkom pipetom svježih 6 ml kultivacijskog medija koji je bio prethodno zagrijan u vodenoj kupelji. Flask se prebrisao kompresom navlaženom dezinficijensom te se vratio natrag u  $\text{CO}_2$  inkubator.

Pri promjeni kultivacijskog medija u dalnjim presa ivanjima nije bila potrebna promjena cijelog volumena medija, već samo polovice, dakle 3 ml. Princip promjene je bio isti kao i kod gore opisane promjene medija.

### 3.2.4. Tripsinizacija

Nakon određenog broja dana (~10 dana), kad su stanice dosegnule konfluentnost od oko 80% bilo ih je potrebno odignuti od plastiće podloge te u novom presu ivanju nasaditi u novi flask.

U vodenoj kupelji se zgrijao kultivacijski medij, sterilna fiziološka otopina puferirana fosfatima (PBS; Macopharma, Francuska) i 0,25% Tripsin-EDTA otopine (Sigma, Njemačka). Pod invertnim mikroskopom se provjerilo stanje stanica uzgojenih u flaskovima i njihova konfluentnost. Flask je zatim prenešen u sigurnosni kabinet. Boce s kultivacijskim medijem i sterilnim PBS prebrisane su dezinficijensom prije nego su bile unešene u sigurnosni kabinet. Iz kultivacijskog flaska sterilnom serološkom pipetom uklonjen je sav kultivacijski medij, pazeći i pri tome da se ne dodiruje dno s adheriranim MMS. Novom serološkom pipetom uzelo se 6 ml sterilnog PBS-a te se njime pažljivo ispralo dno flaska. PBS se potom istom pipetom izvukao van i bacio u otpad. Ovaj postupak ispiranja ponovio se još jednom.

Novom sterilnom serološkom pipetom u flask se dodalo 3 ml Tripsin-EDTA otopine, flask se zatvorio i stavio u CO<sub>2</sub> inkubator na 2,5 – 3 minute. Po isteku inkubacije flask se izvadio iz CO<sub>2</sub> inkubatora te se provjerilo pod invertnim mikroskopom da li su se stanice u inkovito odvojile s plastiće podloge. Djelovanje enzima se zatim brzo zaustavilo dodavanjem 5 ml PBS u flask. Sadržaj flaska se pipetom izvukao u novu sterilnu epruvetu te se dno još jednom lagano ispralo. Sadržaj epruvete se iscentrifugirao na 2300 rpm/3 min/RT.

Nakon centrifugiranja supernatant se dekantirao, a talog sa stanicama se resuspendirao u 1-2 ml kultivacijskog medija. Sadržaj se homogenizirao sterilnom pasteurovom pipetom te se tom istom pipetom mala količina suspenzije izdvojila za potrebe brojanja stanica i određivanja vijabilnosti (vidjeti 3.2.1).

U svakom sljedećem presu ivanju, tripsinizacija je rađena na jednak način. Nakon prvog presa ivanja stanice su nasađivane u gustoću i 1000 st/cm<sup>2</sup> i označavane kao MMS.

Nakon prvog presa ivanja postupak tripsinizacije se radio svaki 7. dan.

## 3.3. Test klonogenog potencijala mezenhiskih matičnih stanica

### 3.3.1. Postavljanje testa klonogenog potencijala mezenhimske matice ni stanica

Test klonogenog potencijala MMS (engl. colony forming unit – fibroblast ; CFU–F test) izvodio se radi procjene kapaciteta klonalnog umnažanja MMS.

Nakon tripsinizacije, a paralelno s nasa ivanjem MMS u flaskove bilo je potrebno postaviti i CFU-F test.

Za potrebe CFU-F testa stanice su nasa ivane u koncentraciji od  $2 \text{ MSC/cm}^2$  u dvije petrijeve zdjelice (TPP, Švicarska) površine  $150 \text{ cm}^2$ . To zna i da je potreban broj stanica koje su se nasa ivale bio 300 po jednoj petrijevoj zdjelici u volumenu od 10 ml kultivacijskog medija.

U sigurnosnom kabinetu se u pripremljenu epruvetu od 50 ml sterilnom pipetom dodalo 20 ml kultivacijskog medija u kojeg se dodalo odgovaraju i volumen stani ne suspenzije koja je sadržavala 600 stanica. Pripremljena stani na suspenzija za CFU-F test dobro se promiješala sterilnom serološkom pipetom te se njome sav sadržaj prebacivao i jednakomjerno razdijeljivao u 2 pripremljene i prethodno oznaene petrijeve zdjelice.

Dva puta tjedno je 1/3 medija zamjenjena svježim kultivacijskim medijem, a postupak je bio isti kako je opisan u *Promjena medija* (vidjeti 3.2.3., provjeriti da li je isti broj)

### 3.3.2. Kontrastno bojanje kolonija

Nakon 10 dana kulture *in vitro* formirane MMS-kolonije adherirane na plasti no dno petrijevih zdjelica su brojane. Ovaj dio testa se nije izvodio u sterilnim uvjetima.

Iz CO<sub>2</sub> inkubatora su se izvadile dvije petrijeve zdjelice te se pod invertnim mikroskopom provjeravalo stanje rastu ih kolonija. Nakon toga na radnome stolu su pripremljeni potrebni materijali za bojanje kolonija. Pripremljen je isti PBS, aceton (Merck, Njema ka) i etanol (Merck, Njema ka). U jednoj staklenoj boci pripremila se mješavina aceton – metanola u omjeru 3 : 2.

Pipetom se iz petrijevih zdjelica prvo odlio kultivacijski medij. Zatim se s po 10 ml PBS lagano ispralo dno svake petrijeve zdjelice. Ovo ispiranje se ponovljalo još dva puta. Potom se u svaku zdjelicu pipetom doljevalo po 10 ml mješavine aceton – metanola. Petrijeve zdjelice su potom poklopljene kako bi se kolonije fiksirale tijekom 15 minuta. Nakon isteka vremena mješavina za fiksiranje se odlila, a petrijeve zdjelice su ostavljene da se osuše na zraku. Nakon što su se osušile u njih se dodalo po 10 ml deionizirane vode. Nakon rehidracije voda se odlila, a u svaku se zdjelicu novom pipetom dodalo po 10 ml boje (Harry's hemotoxylin staining, Merck, Njema ka) koja se pustila da djeluje 10 – 12 min. Boja se zatim odlila, a zdjelice se lagano, ali što temeljitije ispirale pod teku om vodom iz slavine.

Nakon što su se uzorci osušili na zraku pristupalo se brojanju kolonija tako da su se obje petrijeve zdjelice okrenule dnom prema gore, a svaka prebrojana kolonija MMS se označava markerom kako ne bi došlo do zabune pri brojanju. Nakon što su prebrojane sve kolonije

izra unavala se srednja vrijednost broja kolonija iz obje petrijeve zdjlice, a podatak se unosio u bazu podataka.

### 3.4. Imunofenotipizacija

Tijekom 2., 3. i 4. presa ivanja određene stanice su imunofenotipirane. Ukratko, nakon postupka tripsinizacije, stanice su isprane u istom PBS. Određen je broj stanica u suspenziji i podešena koncentracija stanica na minimalno  $1 \times 10^6$  st/ml. Slijedeći protutijela su korištena u svrhu jednobojskog označavanja stanica: CD45-FITC (Dako, Danska), CD34-PE (BD, Njemačka), CD14-PE (Dako, Danska), HLA-DR-PE (Dako, Danska), CD90-FITC (BioLegend, SAD), CD105-FITC (BioLegend, SAD) i njima pripadajuće izotipske kontrole IgG1-FITC (Dako, Danska) i IgG2a-PE (Dako, Danska).

U označene plastične tubice za prototipnu citometriju dodano je po 10 µl monoklonskog protutijela na koje se dodalo po 100µl stanice suspenzije pripremljene u PBS-u. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Po isteku inkubacije, u svaku tubicu se dodalo po 2ml PBS, prodrmalo se sadržaj na držalici te iscentrifugirao (2300rpm/3min) sa svrhom ispiranja suviška protutijela. Supernatant se potom dekantirao, a talog stanica resuspendirao u 0.3 ml PBS. Tako pripremljeni uzorci bili su spremni za propuštanje i analizu na prototipnom citometru (FACSCalibur, BD, Njemačka).

Pri analizi, na prikazu propuštenog uzorka stavila se ograda oko populacije mezenhimskih stanica te se unutar te ogradi analizirao udio stanica koje su vezale specifične protutijele. Pozitivitet od 20% na više se smatrao pozitivnim nalazom. Podešenja prilikom propuštanja obilježenih uzoraka kroz prototipni citometar bila su takva da je fluorescencija (FL) koja je poticala od protutijela obilježenih fluorokromom fluorescein-izotiocijanat (FITC) detektirana na FL1-kanalu (emisija zelene svjetlosti), a ona od fikoeritrina (PE na FL2-kanalu (emisija u crvenonaranjem spektru). Dobiveni rezultati analizirani su u unalnim programom CellQuest (BD, Njemačka).

### 3.5. Obrada podataka

Kako bi se izračunao rast stanica i udvostručenje populacije MMS u kultivacijskim flaskovima, prilikom svakog presa ivanja u obzir su se uzimala dva relevantna podatka koji su unesena u tablicu. Jedan je bio broj stanica koji je nasađen prilikom svakog presa ivanja ( $N_1$ ), a drugi je bio broj stanica prikupljen prilikom tripsinizacije ( $N_H$ ). Ti podatci uneseni su u formulu:

$$X = [\log_{10}(N_H) - \log_{10}(N_1)] / \log_{10}(2)$$

prema kojoj su izraene krivulje rasta MMS svakog dobrovoljnog davatelja koštane srži.

Srednje vrijednosti broja kolonija MMS prilikom svakog presa ivanja, izraslih u petrijevim zdjelicama također su unesene u tablicu te su prema dobivenim vrijednostima izraene krivulje.

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Dobrovoljni davatelji koštane srži

Korišteni su uzorci tri zdrava dobrovoljna davatelja (DD) koji su potpisali informirani pristanak za doniranje malog volumena KS u svrhu istraživanja. Dva dobrovoljna davatelja bila su muškog, a jedan ženskog spola. Ženski DD bio je najmlađi (18 godina) dok su muški DD-i bili u dobi od 23 i 53 godine (Tablica 1).

**Tablica 1:** Dobrovoljni davatelji koštane srži

DD	spol	dob
1	m	23
2	ž	18
3	m	53

#### 4.2. Morfologija mezenhimskih mati nih stanica

Mezenhimske mati ne stanice (MMS) uzgajane u CO<sub>2</sub> inkubatoru (Slika 1) adherirale su na plastičnu podlogu kultivacijskih flaskova. U svim fazama rasta uzgajane stanice su ispoljavale vretenastu fibroblastnu morfologiju karakterističnu za MMS uzgojene u kulturi stanica *in vitro* (Slika 2).



**Slika 1:** Kultivacijski flaskovi u kojima su uzgajane MMS *in vitro*.



**Slika 2:** Karakterističan vretenasti izgled uzgojenih MMS adheriranih na plastičnoj podlozi.

#### 4.3. Analiza rasta mezenhimskih matičnih stanica

Rast MMS pronađen je u vremenskom periodu od nekoliko tjedana. U tom vremenu napravljeno je prosječno 5 presaivanja MMS svakog DD. Rast MMS prije svakog ciklusa presaivanja bio je ograničen na 7 dana kada je dosegnuta prosječna konfluentnost stanica oko 80%. Rezultati povećanja broja stanica na kraju svakog ciklusa presaivanja za svaki uzorak MMS pojedinačno su navedeni u Tablici 2 te je izračunat ukupan broj udvostrućenja tijekom vremenskog perioda obuhvata enog s 5 ciklusa presaivanja stanica.

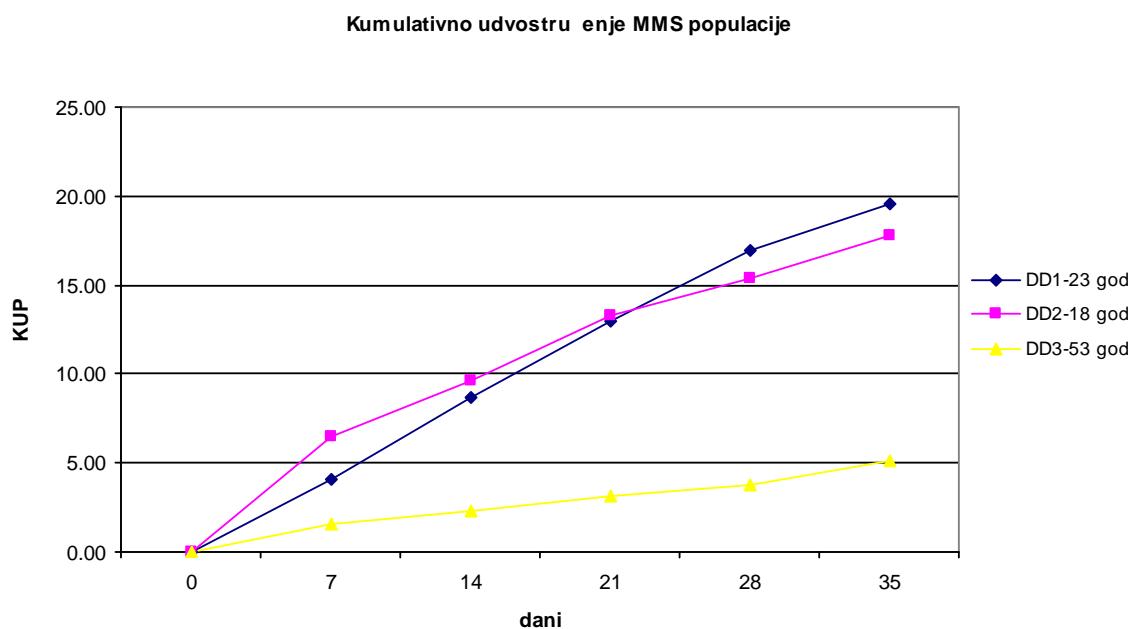
**Tablica 2:** Udvostrućenje broja MMS prilikom uzgoja *in vitro*.

Ciklus presaivanja stanica / broj dana uzgoja <i>in vitro</i>	Dobrovoljni davatelj 1		Dobrovoljni davatelj 2		Dobrovoljni davatelj 3	
	Udvostrućenje stanične populacije *	Kumulativno udvostrućenje stanične populacije **	Udvostrućenje stanične populacije *	Kumulativno udvostrućenje stanične populacije **	Udvostrućenje stanične populacije *	Kumulativno udvostrućenje stanične populacije **
<b>0.d</b>	0	0	0	0	0	0
<b>p1 / 7.d</b>	4.08	4.08	6.48	6.48	1.53	1.53
<b>p2 / 14.d</b>	4.64	8.72	3.13	9.62	0.78	2.31
<b>p3 / 21.d</b>	4.30	13.02	3.65	13.27	0.78	3.09
<b>p4 / 28.d</b>	3.92	16.95	2.14	15.41	0.64	3.73
<b>p5 / 35.d</b>	2.64	<b>19.59</b>	2.41	<b>17.82</b>	1.40	<b>5.13</b>
Prosječno vrijeme potrebno za jedno udvostrućenje broja stanica	$(35 \text{ d} \times 24 \text{ hr}) : 19.59 = 43 \text{ hr}$		$(35 \text{ d} \times 24 \text{ hr}) : 17.82 = 47 \text{ hr}$		$(35 \text{ d} \times 24 \text{ hr}) : 5.13 = 164 \text{ hr}$	

\* $x = (\log_{10}(N_h) - \log_{10}(N_1)) / \log_{10}(2)$

\*\* zbrajaju se pojedinačno udvostrućenja po svakom ciklusu presaivanja stanica

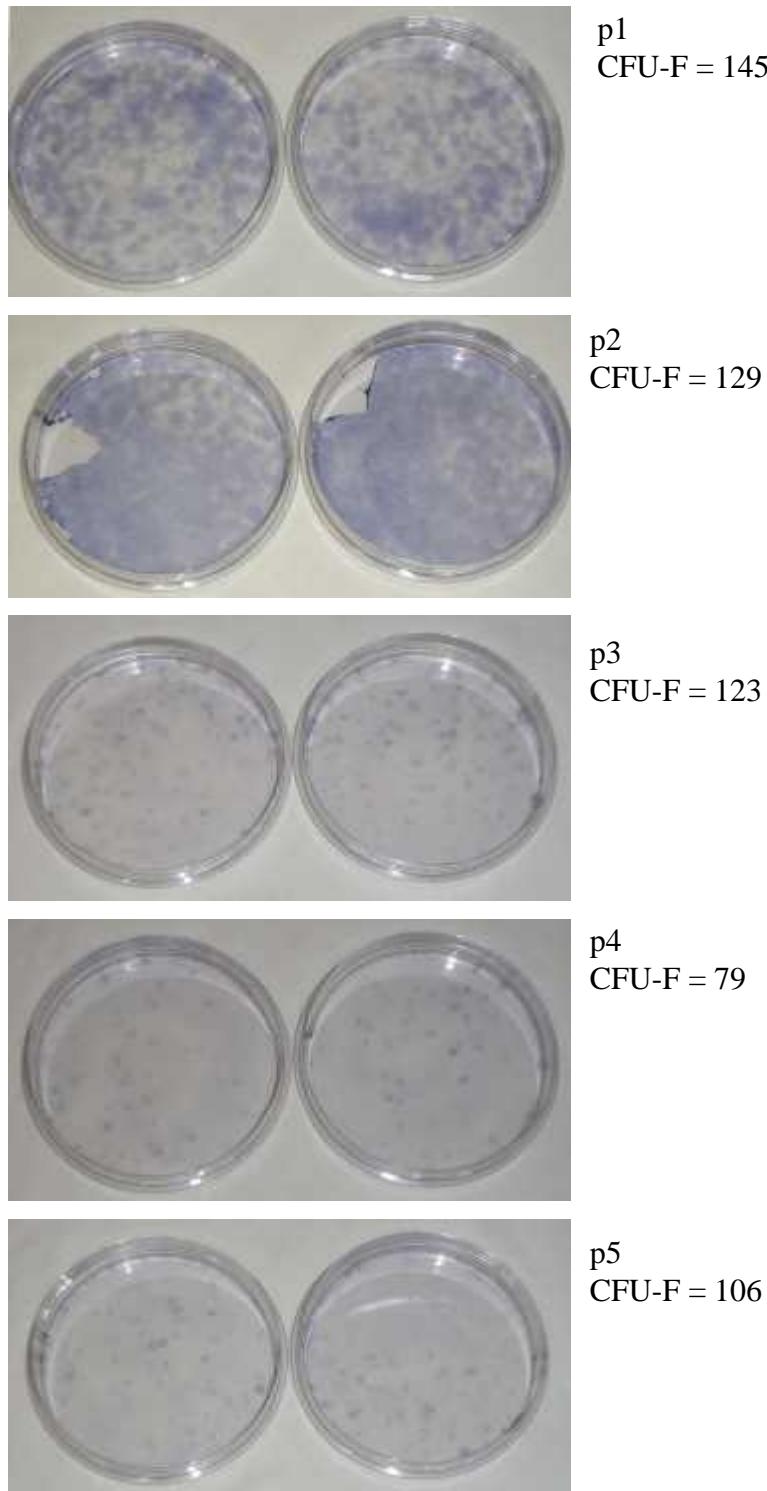
Tijekom 35 dana uzgoja MMS *in vitro*, stanice koje su potjecale od DD1 podvostru ile su se u broju 19.6 puta, stanice od DD2 17.8 puta i stanice DD3 5.13 puta. Iz dobivenih rezultata dalo se izra unati da je prosje no vrijeme potrebno za udvostru enje stani ne populacije u slu aju MMS-DD1 iznosilo 43 sata, MMS-DD2 47 sati i u slu aju MMS-DD3 164 sata. Iz dobivenih rezultata rasta vrlo je uo ljiva razlika kinetike rasta broja stanica koje su potjecale od mla ih dobrovoljnih davatelja u odnosu na stanice podrijetlom od najstarijeg dobrovoljnog davatelja (MMS-DD3) (Slika 3).



**Slika 3.** Grafi ki prikaz razlika u kumulativnom porastu broja uzgojenih MMS *in vitro*.

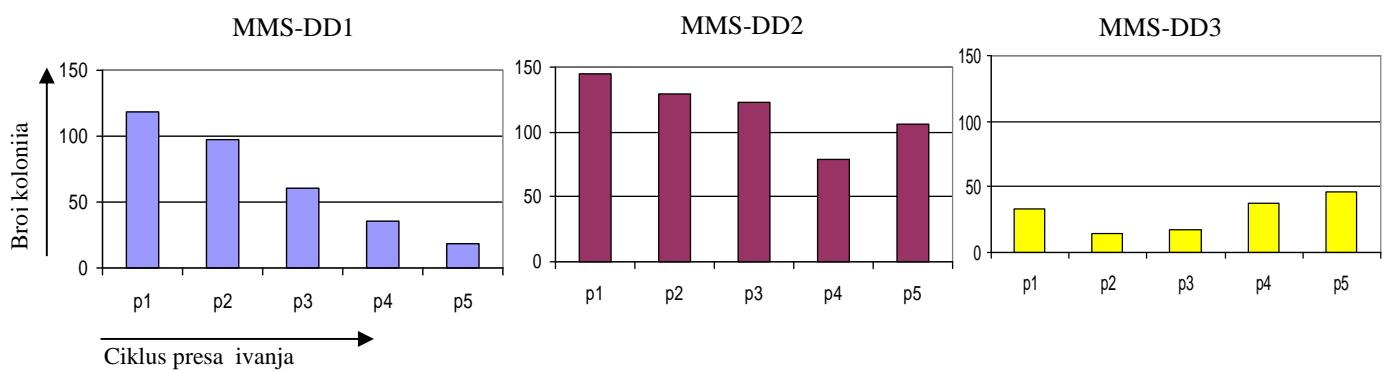
#### 4.4. Klonogeni potencijal mezenhimskih mati nih stanica

Klonogeni potencijal MMS odre ivan je CFU-F testom koji je pripremljen prilikom svakog ciklusa presa ivanja. Nakon 10 dana uzgoja MMS u sklopu CFU-F testa, formirane kolonije su fiksirane, obojane i prebrojane (Slika 4).



**Slika 4.** CFU-F - obojane kolonije MMS-DD2 u svih 5 ciklusa presa ivanja.

Iz pojedina nih prikaza broja CFU-F kolonija svakog od dobrovoljnih davatelja (Slika 5), vidljivo je da klonogeni potencijal MMS podrijetlom od najstarijeg donora (DD3) pokazuje najslabiji klonogeni potencijal u ranim ciklusima presa ivanja.

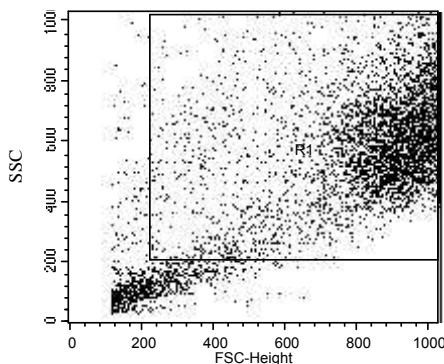


**Slika 5.** Broj kolonija MMS dobivenih u CFU-F testu u sva tri dobrovoljna davatelja.

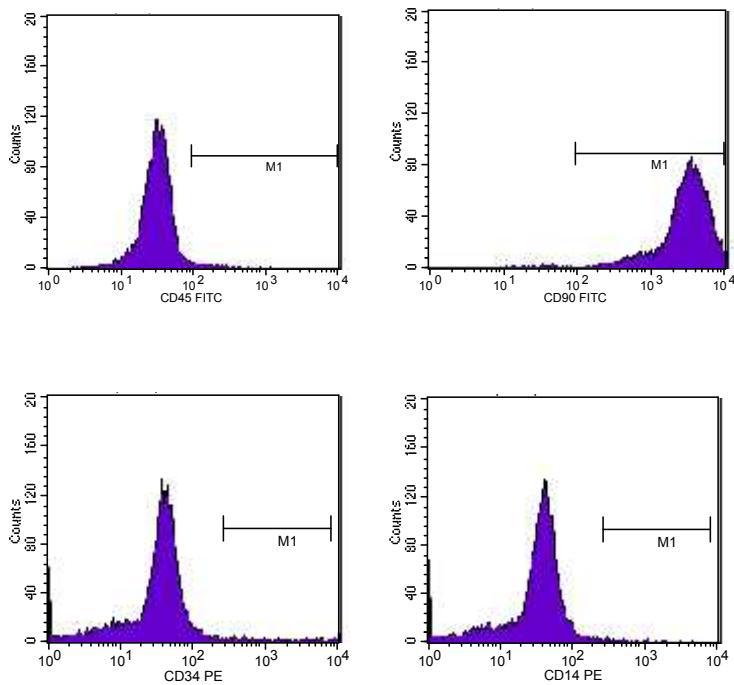
#### 4.5. Imunofenotip uzgojenih mezenhimskih mati nih stanica *in vitro*

Imunofenotip uzgojenih MMS *in vitro* određivan je prilikom 2., 3. i 4. ciklusa presa ivanja stanica. U tim fazama uzgoja stanica *in vitro* očekuje se homogenija stani na populaciju što se, među ostalim značajka, očituje i u njihovom imunofenotipu.

Stančni uzorci obilježavani su monoklonskim protutijelima koja su se vezala za antigene na površini uzgojenih stanica. Izražaj pojedinog antiga koji je iznosio  $\geq 20\%$  smatrano je pozitivnim nalazom (Slika 6 i 7).



**Slika 6.** Proto-nocitomeetrijski prikaz uzgojenih MMS. Na FSC/SSC kanalu (*engl. forward scatter/side scatter*) vidljivo je da se radi o homogenoj populaciji velikih stanica.



**Slika 7.** Imunofenotip uzgojenih MMS. Jednoparametrijski prikaz fluorescencije stanica u kojem je intenzitet fluorescencije stanica izražen u odnosu na broj analiziranih stanica.

Iz analiziranog imunofenotipa uzgojenih MMS *in vitro* vidljivo je da se već u ranim ciklusima presa iivanja izgubio izražaj panleukocitnog biljega CD45, krvotvornog biljega CD34, monocitnog biljega CD14, dok je vidljiv značajan izražaj biljega CD90 (Tablica 3). Sve navedeno povezuje se sa značajkama MMS.

**Tablica 3.** Imunofenotip MMS dobrovoljnih davatelja u 2., 3. i 4. ciklusu presa iivanja.

DD	p2	p3	p4
1*	CD45-CD105+CD90+	CD45-CD105+CD90+	CD45-CD90+
2	CD45-CD105-CD90+CD14-HLADR-CD34-	CD45-CD105-CD90+CD14-HLADR-CD34-	CD45-CD105-CD90+CD14-HLADR-CD34-
3	CD45-CD105-CD90+CD14-HLADR-CD34-	CD45-CD105-CD90+CD14-HLADR-CD34-	CD45-CD105-CD90+CD14-HLADR-CD34-

\* Zbog tehničkih problema nije bilo moguće odrediti veći broj biljega u MMS-DD1 stanom uzorku.

## **5. RASPRAVA**

Prilikom transplantacija raznih tkiva esto dolazi do komplikacija koje se više ili manje uspješno lije e. Alogena transplantacija krvotvornim mati nim stanicama (KMS) je uhodana i standardna terapija u slu aju više hematoloških oboljenja. No, oporavak pacijenata nakon transplantacije ovisi o nekoliko imbenika i potpun hematološki oporavak nije uvijek slu aj. Uzrok slabe hematološke funkcije nakon transplantacije KMS je esto povezan s pojmom infekcije citomegalovirusom i/ili reakcije presatka protiv primatelja (*GvHD*). Mnoge klini ke studije potvrđile su da MMS transplantirane kao auto- ili alotransplantat znatno olakšavaju prihva anje primarnog transpantata te smanjuju u estalost nuspojava i komplikacija izazvanih u posttransplantacijskom razdoblju (1,9).

Iako MMS nalazimo u raznim tkivnim izvorima, do sada je naj eš e korištena KS kao glavni tkivni izvor MMS u klini kim studijama (2,7). Zastupljenost MMS u KS je samo 2-5 MMS u  $10^6$  mononuklearnih stanica (MNS) (2). Iz navedenog je o ito da je MMS neophodno umnožiti *ex vivo* kako bi u inkovito izvršile svoju funkciju prilikom transplantacije. Stoga je klju no kreirati protokol umnažanja MMS *in vitro* koji bi omogu io njihovo kvalitetno umnažanje u što kra em vremenu, a da umnožene MMS zadrže sva svojstva neophodna za njihov klini ki u inak.

U ovom radu, MMS su izolirane iz KS dobrovoljnih davatelja. Umnažane su u kultivacijskom mediju koji je bio oplemenjen s 10% lizata ljudskih trombocita (LT). Na taj na in se nastojalo izbjegi upotrebu suplemenata životinjskog porijekla, poput fetalnog gove eg seruma, koji predstavljaju potencijalan rizik za prijenos stranih antigena i prionskih bolesti (4,5). U svim fazama uzgoja MMS su ispoljavale svoje karakteristi ne zna ajke; adherirale su za plasti nu površinu kultivacijskih flaskova, ispoljavale tipi nu vretenastu morfologiju, ispoljavale imunofenotip karakteristi an za MMS te u CFU-F testu polu ile rastom fibroblastnih kolonija. Rast MMS razli itih dobrovoljnih davatelja bio je obilježen razli itom kinetikom kroz 5 ciklusa presa ivanja. Stani ni uzorci MMS-DD1 i MMS-DD2 tijekom 35 dana uzgoja *in vitro* polu ili su zna ajno boljim rastom stanica u usporedbi s MMS-DD3. Tako se stani na populacija MMS-DD1 tijekom tog perioda 19,6 puta udvostruila, a prosje no vrijeme potrebno za podvostru enje stanica je iznosilo 43 sata. U slu aju MMS-DD2, situacija je bila sli na, stanice su 17,8 udvostruile svoj broj, a prosje no vrjeme udvostru enja je iznosilo 47 sati. Dobrovoljni davatelji DD1 i DD2 bili su stari 23 i 18 godina. U slu aju stanica koje su potjecale od najstarijeg dobrovoljnog davatelja DD3 (53 godine), tijekom 35 dana uzgoja,

stanice su se udvostru ile samo 5,1 puta, a za jedan ciklus udvostru enja bilo im je potrebno prosje no 164 sati, tj. 7 dana.

Isti trend kinetike rasta MMS uzoraka potvr en je i CFU-F testom. Dok MMS-DD1 i MMS-DD2 uzorci najve i broj fibroblastnih kolonija polu uju u najranijim ciklusima presa ivanja (p2 i p2), MMS-DD3 daje lagani porast kolonija tek u 5. ciklusu presa ivanja. S obzirom da su najranije faze rasta klini ki zna ajne i potencijalno upotrebljive za transplantaciju, na primjeru ova tri dobrovoljna davatelja o ito je kako biološka raznolikost, u ovom slu aju starosna dob davatelja, utje e na rezultat umnažanja MMS *in vitro* (8,10).

S obzirom da su stanice sva tri davatelja u svim fazama rasta ispoljavale imunofenotip i morfologiju MMS, ta razlika se nije o itovala na karakteristikama MMS ve samo na kinetici rasta koja je klju an imbenik u slu ajevima kada je potrebno u kratkom vremenu umnožiti što ve i broj MMS za potrebe transplantacije.

Uzevši u obzir injenicu da je KS zdravih davatelja vrlo dragocjen i rijedak uzorak, u ovom radu korišteni su uzorci samo tri dobrovoljna davatelja. Na tako malom eksperimentalnom uzorku razlike su bile o ite, ali istraživanje svakako zahtjeva dodatna ispitivanja na ve em broju ispitanika.

## **6. ZAKLJU AK**

- U kultivacijskom mediju oplemenjenom s 10% lizata ljudskih trombocita mogu e je uspješno umnožiti MMS.
- U svim fazama uzgoja MMS su ispoljavale svoje karakteristi ne zna ajke; adherirale su za plasti nu površinu kultivacijskih flaskova, ispoljavale tipi nu vretenastu morfologiju, ispoljavale imunofenotip karakteristi an za MMS te u CFU-F testu polu ile rastom fibroblastnih kolonija.
- Rast MMS razli itih dobrovoljnih davatelja bio je obilježen razli itom kinetikom što je mou e povezati sa starosnom dobi dobrovoljnih davatelja. Kako su najranije faze rasta klini ki zna ajne i potencijalno upotrebljive za transplantaciju, na primjeru ova tri dobrovoljna davatelja o ito je kako biološka raznolikost, u ovom slu aju starosna dob davatelja, utje e na rezultat umnažanja MMS *in vitro*.

## **7. LITERATURA**

1. Aerts F, Wagemaker G. Mesenchymal stem cell engineering and transplantation. U: Nolta J.A. (ur.): Genetic engineering of mesenchymal stem cells. Dordrecht, Nizozemska: Springer: 2006; 1-44.
2. Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, Pürstner P, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D. Transplantation and cellular engineering. Two steps to functional mesenchymal stromal cells for clinical application. *Transfusion* 2007; 47: 1426-1435.
3. Bieback K, Eichler H. Human mesenchymal stromal cells. U: Areman EM, Loper K (ur.): Celluar therapy: Principles, methods and regulations. Bethesda, SAD: AABB; 2009; 448-466.
4. Capelli C, Domenghini M, Borler G, Bellavita P, Poma R, Carobbio A, Micó C, Rambaldi A, Golay J, Introna M. Human plaelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from samples of bone marrow aspirates or marrow filte washouts. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 785-791.
5. Carrancio S, López-Holgado N, Sanchez-Guijo FM, Villaron E, Barbado V, Tabera S, Diez-Campelo M, Blanco J, San Miguel JF, Concsuelo del Cañizo M. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol* 2008; 36: 1014-1021.
6. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Martini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Procop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statemet. *Cytotherapy* 2006; 8; 4: 315-317.
7. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Ester Bernardo M, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579-1586.
8. Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Makay A, Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematology* 2008; 36: 1176-1185
9. Von Bonin M, Stölzel F, Goedecke A, Richter K, Wuschek N, Hölig K, Platzbecker U, Illmer T, Schaich M, Schetelig J, Kiani A, Ordemann R, Ehninger G, Schmitz M, Bornhäuser M. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant* 2008; 1-7.

10. Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD. Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. *PLoS ONE* 3(5): e2213