

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

studijní program: Biomedicína

studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



**MUDr. Robert Pytlík**

LIDSKÉ MULTIPOTENTNÍ MEZENCHYMOVÉ STROMÁLNÍ BUŇKY - KOSTNÍ  
DIFERENCIACE A PODPORA KRVETVORBY

**HUMAN MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS - BONE  
DIFFERENTIATION AND HEMATOPOIETIC SUPPORT**

Dizertační práce

Ph.D. Thesis

Školitel/Supervisor: prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

**Praha 2017**

# Prohlášení

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Vědecké výsledky publikované v této práci byly z největší části publikované v odborné literatuře, případně jde o dílčí výsledky probíhajícího výzkumu, které jsou však z hlediska zaměření prezentované dizertační práce podstatné. Výsledky prezentované v této dizertační práci jsou výsledky pracovního kolektivu, ale všechny publikované práce byly mnou koncipovány či spolukoncipovány a bez mého přínosu by nemohly být realizovány. Současně prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

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

V Praze, dne 14.6.2017

MUDr. Robert Pytlík

Podpis:

## Identifikační záznam

PYTLÍK, ROBERT. *Lidské multipotentní mezenchymové stromální buňky - kostní diferenciaci a podpora krvetvorby*. [HUMAN MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS - BONE DIFFERENTIATION AND HEMATOPOIETIC SUPPORT]. Praha, 2017, 151 stran, 4 přílohy, Dizertační práce (Ph.D.), Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 1. interní klinika. Školitel: prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

*Tato práce je věnovaná mým rodičům, mé ženě Markétě a synu Jakubovi, jakož i našim dvěma věrným kočkám, Košínovi a Želvíkovi*

## **Poděkování**

V první řadě bych rád poděkoval svému školiteli, prof. MUDr. Markovi Trněnému, CSc., za veškerou pomoc a podporu, které se mi od něj po celou dobu doktorského studia dostávalo.

Rád bych rovněž poděkoval bývalému přednostovi 1. interní kliniky 1. LF UK, profesoru MUDr. Pavlovi Klenerovi, DrSc., za nabídku výzkumu mezenchymových kmenových buněk na jeho pracovišti a za jeho všestrannou podporu zejména v prvních fázích projektu.

Děkuji též profesoru MUDr. Emanuelu Nečasovi za nezištně poskytnutý přístup k přístrojům na Ústavu patologické fyziologie VFN a Mgr. Viktorovi Sýkorovi za umožnění provádění zvířecích experimentů. Též děkuji týmu dr. rer. medic. paní Claudii Rentsch a drážďanskému týmu za umožnění provedení experimentů na potkanech, které se nepodařilo realizovat v ČR.

Zvláštní poděkování náleží profesoru MUDr. Karlu Smetanovi ml., DrSc., za podporu zejména v prvních fázích projektu a profesoru MUDr. Karlu Smetanovi st., DrSc., za to, že mi již před více než dvaceti lety otevíral taje hematologie a buněčné biologie.

Dále děkuji všem bývalým i současným spolupracovníkům za podporu, pochopení a pomoc při shánění materiálu. Děkuji i všem dobrovolným dárcům mezenchymových buněk, zdravým i nemocným, bez nichž by nebylo možno jakékoli výzkumy provádět.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za podporu a shovívavost v průběhu celého postgraduálního studia.

*Tato práce vznikla za podpory grantů:*

*IGA MZ ČR NR7448/3 (2003)*

*IGA MZ ČR ND8092/3 (2005)*

*IGA MZ ČR ND8225/3 (2005)*

*IGA MZ ČR NT13531/4 (2011)*

*VZ MSM 0021620808 (2004)*

*PRVOUK-P27/LF1/1 (2009)*



# Obsah

Prohlášení	2
Identifikační záznam	3
Poděkování	4
Obsah	5
Seznam použitých zkratk	8
Abstrakt: česká verze	12
Abstrakt: anglická verze	13
<b>1. Úvod</b>	<b>14</b>
1.1. Historie mezenchymových stromálních buněk (MSC)	14
1.2. Charakterizace mezenchymových stromálních buněk	17
1.2.1. Původ mezenchymových stromálních buněk	17
1.2.2. Definice mezenchymových stromálních buněk	17
1.2.3. Kultivace mezenchymových stromálních buněk a jejich chování v buněčné kultuře	18
1.3. Diferenční schopnosti mezenchymových stromálních buněk <i>in vitro</i>	22
1.3.1. Mezodermální tkáň	22
1.3.2. Ektodermální tkáň	25
1.3.3. Endodermální tkáň	25
1.4. Mechanismy působení mezenchymových stromálních buněk <i>in vivo</i>	26
1.4.1. Základní předpoklady	26
1.4.2. Transdiferenciace	27
1.4.3. Buněčná fúze	29
1.4.4. Protizánětlivé, imunomodulační a stimulační působení MSC	29
1.4.5. Podpora krve tvorby	32
1.5. Mezenchymové stromální buňky a regenerativní medicína	34
1.5.1. Terapeutické přípravky bez manipulace <i>in vitro</i>	34
1.5.2. Úskalí přenosu terapeutického potenciálu MSC do klinické praxe	36
1.5.3. Léčebné produkty pro pokročilou terapii (advanced therapy medicinal products, ATMP)	39
1.5.4. Zásady správné klinické praxe (GMP)	41
1.5.5. Uchování MSC pro další použití	44
1.5.6. MSC a jejich využití v kostní a kosterní regeneraci	47
<b>2. Hypotézy</b>	<b>51</b>
2.1. Terapeutické užití hMSC v regenerativní medicíně bez <i>in vitro</i> expanze v rámci koncentrátů mononukleárních buněk z kostní dřeně (BMNC)	51
2.2. Vývoj nových způsobů kultivace hMSC pro užití v regenerativní medicíně	51
2.3. Vlastnosti hMSC pěstovaných v kultivačním médiu s lidským sérem a suplementy	51
<b>3. Cíle práce</b>	<b>52</b>

<b>4. Metodika</b>	<b>53</b>
4.1. Získávání materiálu pro přípravu BMMC a pro kultivace hMSC	53
4.2. Zpracování BMMC produktu pro klinické aplikace.	53
4.3. Kultivace hMSC <i>in vitro</i>	54
4.4. Studium diferenciačních schopností MSC	55
4.5. Studium povrchových antigenů MSC	55
4.6. Stanovení genové exprese MSC	56
4.7. Cytogenetické studie	57
4.8. Kryoprezervace	58
4.9. <i>In vivo</i> preklinické modely	59
4.10. Sledování kvality života	62
4.11. Příprava klinické studie hMSC	62
4.11. Statistické zpracování výsledků	62
<b>5. Výsledky</b>	<b>63</b>
5.1. - Využití nemanipulovaných BMMC v léčbě infarktu myokardu a ischemické choroby dolních končetin	63
5.1.1. Studie intrakoronární injekce autologních BMMC u pacientů s velkým předním infarktem myokardu	63
5.1.2. Autologní intraarteriální infuze mononukleárních buněk z kostní dřeně u pacientů s kritickou ischemií dolních končetin	63
5.2. Optimalizace kultivace hMSC pro klinické užití	67
5.2.1. Zavedení metodiky klasické kultivace hMSC s fetálním telecím sérem a zavedení metodiky trilineární diferenciace hMSC	67
5.2.2. Nová metodika kultivace hMSC	68
5.2.3. Vlastnosti hMSC kultivovaných novou metodikou	75
5.2.3.1. <i>Trilineární diferenciace</i>	75
5.2.3.2. <i>Povrchové znaky</i>	80
5.2.3.3. <i>Profily genové exprese</i>	82
5.2.3.4. <i>Cytogenetická charakterizace hMSC</i>	87
5.2.3.5. <i>Podpora krvetvorby</i>	89
5.2.3.6. <i>Kryoprezervace hMSC pro pozdější použití</i>	90
5.2.4. Preklinické experimenty na zvířecích modelech	93
5.2.4.1. <i>Studie na imunodeficientních myších</i>	93
5.2.4.2. <i>Studie na imunodeficientních potkanech</i>	97
<b>6. Diskuse</b>	<b>105</b>
6.1. Využití nemanipulovaných BMMC v léčbě infarktu myokardu a ischemické choroby dolních končetin	105
6.2. Vývoj nového kultivačního postupu pro pěstování hMSC <i>in vitro</i> a vlastnosti vyvinutého produktu	107
6.2.1. Vývoj kultivačního postupu	107
6.2.2. Vlastnosti hMSC kultivovaných v médiu CellGro™ s lidským sérem a suplementy	111
6.2.2.1. Splnění základních kritérií pro MSC	111
6.2.2.2. Profily genové exprese	112
6.2.2.3. Podpora krvetvorby lidskými MSC	113
6.2.2.4. Kryoprezervace	114

6.3. Bezpečnost a účinnost vyvinutého produktu	115
6.3.1. Cytogenetická stabilita	115
6.3.2. Testování bezpečnosti a účinnosti na imunodeficientních zvířatech	116
6.4. Další osud hMSC produktu kultivovaného v CellGro™ s lidským sérem a suplementy	119
<b>7. Souhrn a závěry</b>	<b>121</b>
<b>8. Literatura</b>	<b>123</b>
<b>9. Seznam příloh</b>	<b>150</b>

## Seznam zkratek

- 1. LF UK** - První lékařská fakulta University Karlovy
- 2D** - dvourozměrný
- 3D** - trojrozměrný
- ADSC** - adipose derived stem cells, kmenové buňky získané z tukové tkáně
- AKT** - proteinová kináza B
- alfa-MEM** - alfa minimální esenciální médium
- alfa-SMA** - alfa smooth muscle actin
- ALP** - alkalická fosfatáza
- aP2** - adipocytový protein 2
- APC** - aktivovaný protein C
- ARID5B** (AT bohatá interaktivní doména 5B, též MRP-2, modulačně regulatorní protein)
- ATMP** - léčebný produkt pro pokročilou terapii
- AV ČR** - Akademie věd České republiky
- BDNF** - brain derived neurotrophic factor, mozkový neurotropický faktor
- bFGF** - bazický fibroblastový růstový faktor, shodný s FGF-2
- BFU-E** - burst forming units, erythroid - erytroidní shluky tvořící jednotka
- BMMC** - bone marrow mononuclear cells, mononukleární buňky z kostní dřeně
- BMP** - kostní morfogenický protein (několik izoform)
- BPI** - baktericidní/permeabilitu zvyšující protein
- CAR** - CXCL12 abundantní retikulární buňky
- CAT** - komise pro pokročilou terapii
- CDH11** - cadherin 11, OB cadherin
- cdNA** - komplementární DNA
- CellGro<sup>TM</sup>** - CellGro<sup>TM</sup> SCGM (CellGro<sup>TM</sup> stem cell growth medium, GellGro médium pro kmenové buňky - hematopoetické)
- CFU-F** - koloniformní jednotka fibroblastová
- CFU-GM** - koloniformní jednotka granulocyto-makrofágová
- CHMP** - komise pro léčebné produkty určené k léčba lidí
- CM** - kompletní médium
- COL1A1** - collagen I
- CPA** - kryoprotektivní agens
- CTGF** - connective tissue growth factor, růstový faktor z pojivových tkání
- CTSK** - cathepsin K
- CXCL** - chemokiny s CXC motivem
- CXCR** - receptory pro chemokiny s CXC motivem. CXCR4 je též jiný výraz pro
- SDFalfa** - stromálně derivovaný faktor alfa
- Cy3** - cyanin 3, fluorescenční barvivo
- DAPI** - 4, 6- diamidino-2-phenylindol
- DMEM** - Dulbeccovo minimální esenciální médium
- DMSO** - dimethylsulfoxid
- DNA** - deoxyribonukleová kyselina
- EBMT** - Evropská společnost pro transplataci krevních a dřevných buněk
- EDTA** - etylendiaminetetraoctová kyselina
- EGF** - epidermální růstový faktor

**EMA** - Evropská léková agentura  
**EMT** - epithelial - mesenchymal transition  
**EU** - evropská unie  
**exp** - experimentální kohorta  
**FACT** - The Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (Nadace pro akreditaci buněčné terapie)  
**FBS** - fetální bovinní sérum  
**FCS** - fetální telecí sérum (totéž, co FBS)  
**FDA** - americká agentura pro potraviny a léky  
**FGF** - fibroblastový růstový faktor (různé izoformy)  
**FGF-2** - fibroblastový růstový faktor 2 (shodný s bFGF)  
**FITC** - fluorescein izothiocyánát, fluorescenční barvivo  
**FN** - fakultní nemocnice  
**FN KV** - Fakultní nemocnice Královské Vinohrady  
**G-CSF** - růstový faktor stimulující granulocytové kolonie  
**GDNF** - glial derived neurotrophic factor, gliální neurotrofický růstový faktor  
**GFP** - zelený fluorescenční protein  
**GFP1** - gliální fibrilární protein 1  
**GITR** - glucocorticoid induced TNFR related protein, glukokortikoidy indukovaný protein příbuzný s receptorem pro tumor nekrozující faktor  
**GM-CSF** - faktor stimulující granulocyto-makrofágové kolonie  
**GMP** - správná výrobní praxe  
**GUSB** - glukuronidáza beta  
**GvHD** - graft versus host disease, nemoc štěpu proti hostiteli  
**HBSS** - Hanksův pufovaný solný roztok  
**HEPA** - vysoce efektivní částicové filtry  
**HGF** - hepatocytární růstový faktor  
**HLA** - lidský leukocytární antigen, totožný s lidským hlavním histokompatibilním komplexem - MHC  
**HLA DR, DP, DQ** - lokusy hlavního histokompatibilního komplexu u člověka (lidské leukocytární antigeny) II. třídy  
**hMSC** - lidské mezenchymové stromální buňky  
**HNF-4alfa** - jaderný hepatální protein 4 alfa  
**HPL** - human platelet lysate, lidský destičkový lysát  
**HSC** - hematopoetické kmenové buňky  
**Hsp** - heat shock protein, protein tepelného šoku  
**IDO** - indoleamin 2,3-dioxygenáza  
**IGF** - insulin-like growth factor, inzulinu podobný růstový faktor  
**IGFBP3** - Insulin-like growth factor binding protein 3  
**IGFR** - receptor pro inzulinu podobný růstový faktor  
**IMDM** - Ivescem modifikované Dulbecco médium  
**ins** - inzulin  
**iPSC** - indukované pluripotentní kmenové buňky  
**ISCT** - Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii  
**ITS** - inzulin-transferrin-selenium  
**JACIE** - Joint Accreditation Committee of ISCT-EBMT (Spojená akreditační komise ISCT-EBMT)

**KGF** - keratinocytový růstový faktor  
**kon** - kontrolní kohorta  
**LAD** - left anterior descending coronary artery  
**LF** - lékařská fakulta  
**LIF** - leukemický inhibiční faktor  
**LL-37** - též CAP-18, cathelicidin antimicrobial peptide, antimikrobiální peptid z katedilicinové rodiny  
**LPL** - lipoproteinová lipáza  
**LS** - lidské sérum  
**M-FISH** - multicoloured fluorescence in situ hybridisation  
**MAP1B** - microtubule associated protein 1B, protein 1B asociovaný s mikrotubuly  
**MCP** - monocyty chemoatrahující protein  
**MHC** - hlavní histokompatibilní komplex  
**MIF** - macrophage migration inhibitory factor, faktor inhibující migraci makrofágů  
**MIP 1b** - macrophage inflammatory protein 1b, makrofágový zánět způsobující protein 1b  
**MSC** - mezenchymová stromální buňka, mezenchymová kmenová buňka  
**MMP** - matrix metaloproteázy  
**MSC-HC** - smíšené kolonie mezenchymových a krvetvorných buněk (pracovní název)  
**MSP-a** - makrofágy stimulující protein a  
**NG2** - neuron-gial antigen 2  
**NO** - oxid dusnatý  
**NS** - nesignifikantní  
**NT3** - neurotropin 3  
**Oct-4** - octamer-binding transcription factor 4, oktamer vážící transkripční faktor 4  
**PBPC** - progenitorové (hematopoetické) buňky z periferní krve  
**PBS** - fosfátem pufovaný solný roztok  
**PCR** - polymerázová řetězová reakce  
**PDGF** - platelet-derivet growth factor, destičkový růstový faktor  
**PDGF-AA, AB, BB, C, D** - různé izoformy destičkového růstového faktoru  
**PDGFR** - receptor pro destičkový růstový faktor  
**PE** - phycoerythein, fykoerytein, fluorescenční barvivo  
**PE-Cy5** - phycoerythein-cyanin5, konjugované imunofluorescenční barvivo  
**PerCP** - peridinin-chlorophyll-protein complex (komplex peridinin-chlorofylového proteinu, imunofluorescenční barvivo)  
**PIGF** - placentární růstový faktor  
**PLLA** - poly-L-laktidová kyselina  
**PPAR-gamma** - peroxisome proliferator-activated receptor gamma, receptor gamma aktivovaný peroxizómovým proliferátorem  
**PRP** - platelet rich plasma, plazma bohatá na destičky, též platelet releasate in plasma, růstové faktory uvolněné z destiček v plazmě  
**qRT-PCR** - kvantitativní real-time PCR  
**RANTES** - regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (aktivací regulovaný, exprimovaný a secernovaný normálními T buňkami, též CCL5 (chemokin s C-C motivem)

**RIA** - ramus interventricularis anterior  
**RNA** - ribonukleová kyselina  
**RPLPO** - large ribosomal protein  
**S** - suplementy v kultivačním médiu Pytlík et al, 2009 (askorbát, dexamethason, inzulin, EGF, PDGF-BB, FGF-2, ev. M-CSF)  
**SCF** - stem cell factor  
**SDF alfa** - stromálně derivovaný faktor alfa, funkčně shodný s CXCR4  
**SOP** - standardní operační postupy  
**Sox2** - transkripční faktor, též SRY (sex determining region Y)-box 2  
**STC1** - stanniokalcin  
**SÚKL** - Státní ústav pro kontrolu léčiv  
**SVF** - stromální vaskulární frakce  
**TBP** - TATA-box binding protein  
**TGF** - transformující růstový faktor  
**TIMP** - tkáňový inhibitor metaloproteáz  
**TSG6** - TNF-alfa stimulovaný gen/protein  
**UEPA** - velmi vysoce efektivní částicové filtry  
**ÚHKT** - Ústav hematologie a krevní transfuze  
**v-Ha-ras** - Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog  
**v-myc** - myelocytomatosis viral related oncogene  
**VEGF** - vaskulární endotelový růstový faktor  
**VEGF-A, B, C, D** - různé izoformy vaskulárního endotelového růstového faktoru  
**VEGFR** - receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor  
**VFN** - Všeobecná fakultní nemocnice  
**w/v** - ředění váha na objem (weight/volume)  
**WHO** - Světová zdravotnická organizace

## Abstrakt

Klíčová slova: lidské mezenchymové stromální buňky, regenerace, imunomodulace, diferenciacie, *in vivo* modely, cytogenetika

Lidské mezenchymové stromální buňky (hMSC) jsou dospělé kmenové či progenitorové buňky, jejichž fyziologickou úlohou je napomáhat reparaci poškozených tkání. To se děje především sekrecí trofických, angiopoetických a imunomodulačních faktorů. Kromě toho mají hMSC potenciál diferencovat se *in vitro* do různých specializovaných buněčných typů, převážně mezodermové linie. Lidské MSC rovněž významně podporují krvetvorbu v rámci hematopoetické niche. Tyto poznatky vzbudily velké naděje na terapeutické využití hMSC, zejména v oblasti regenerativní medicíny a léčby autoimunních onemocnění, včetně reakce štěpu proti hostiteli (GvHD). Jako důkaz správnosti tohoto konceptu posloužily zpočátku hrubé preparáty mononukleárních buněk kostní dřeně (BMMC), které malá množství hMSC buněk obsahují. Na našem pracovišti byly provedeny pilotní klinické studie s BMMC v léčbě akutního infarktu myokardu (předčasně ukončená neúspěšná studie) a v léčbě ischemické choroby dolních končetin (studie se slibnými výsledky). Další výzkum probíhal s cílem optimalizace metodiku kultivace hMSC pro klinické užití, tedy dosažení co největších výtěžků a zbavení postupu xenogenních bílkovin. Lidské MSC byly totiž klasicky kultivovány v research grade médiích (např. alfa-MEM) s fetálním telecím sérem (FCS), které může vést k imunizaci pacienta při opakovaném podání hMSC. Bylo dosaženo výrazného úspěchu při použití clinical grade média CellGro™ SCCM s 10% lidským sérem a suplementací askorbátem, dexamethasonem, EGF, PDGF-BB, FGF-2, ev. M-CSF, kdy jsme po 2 týdnech kultivace konzistentně dosahovali výtěžků kolem  $2.5 \times 10^6$  hMSC na  $10^6$  použitých BMMC, oproti cca  $5 \times 10^4$  hMSC/ $10^6$  BMMC při použití média alfa-MEM s FCS. Tímto způsobem získané hMSC splňovaly konsenzuální kritéria pro mezenchymové stromální buňky a pohotově diferencovaly obzvláště do osteogenní linie, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. Nově vyvinutý způsob kultivace hMSC dosáhl patentové ochrany české (patent 301 148 z r. 2009) i evropské (číslem EP 1999250 z r. 2011). K bližší charakterizaci buněk pěstovaných v CellGro™ byly studovány profily jejich genové exprese a byla prokázána zvýšená exprese několika genů důležitých pro kostní diferenciaci. Růst a osteogenní diferenciacie hMSC kultivovaných v CellGro™ byly lepší v *in vivo* modelu na polyaktidovém nosiči v imunodeficientních myších než hMSC pěstované s FCS. Rovněž byla prokázána účinnost hMSC kultivovaných v CellGro™ a aplikovaných v plazmatické sraženině do kritického femorálního defektu u imunodeficientních potkanů, kde buňky zlepšovaly iniciální novotvorbu kosti a též vaskularizaci defektu. Lidské MSC v defektu zůstávaly po dobu až 16 týdnů, nepoškozovaly pokusná zvířata, jen omezeně migrovaly do vzdálených orgánů a netvořily nádory. Bohužel při hodnocení jejich cytogenetické stability byly zjištěny klonální abnormality karotypu, takže toho času novým způsobem kultivované hMSC nejsou vhodné pro klinické studie. Je ovšem možné, že vzniklé cytogenetické abnormality jsou klinicky nesignifikantní, k zodpovězení této otázky je ovšem nutný další výzkum.



## Abstract

Key words: human mesenchymal stromal cells, regeneration, immunomodulation, differentiation, *in vivo* models, cytogenetics

Human mesenchymal stromal cells (hMSC) are adult stem or progenitor cells, which physiological role is repair of damaged tissues. This is achieved mostly by secretion of trophic, angiopoietic and immunomodulatory factors. Besides this, hMSC have potential to differentiate *in vitro* into specialized cells, especially of the mesodermal lineages. Human MSC also significantly support hematopoiesis in hematopoietic niche. This knowledge raised high hopes for therapeutic use of hMSC, especially in regenerative medicine and treatment of autoimmune diseases, including graft versus host disease (GvHD). As a proof of concept served initially crude preparations of bone marrow mononuclear cells (BMMC), which contain small numbers of hMSC. In our hospital, two pilot clinical studies with BMMC were performed: study of treatment of acute myocardial infarction (negative, prematurely terminated) and study of treatment of peripheral leg artery disease (promising results). Further research was aimed on optimization of hMSC cultivation method for clinical use to obtain highest possible yield and get free from animal proteins. Human MSC were traditionally cultivated in research-grade media with fetal calf serum (FCS), which can lead to immunization of patients after repeated application of hMSC. We achieved excellent results with the clinical grade CellGro™ SCCM medium with 10% human serum, supplemented by ascorbate, dexamethasone, insulin, EGF, PDGF-BB, FGF-2, eventually M-CSF. In this medium, yield of hMSC after 2 weeks of cultivation was consistently about  $2.5 \times 10^6$  hMSC/ $10^6$  seeded BMMC (in comparison with about  $5 \times 10^4$  hMSC/ $10^6$  BMMC with alpha-MEM and fetal calf serum). Cells prepared in CellGro™ fulfilled consensus criteria for MSC and readily differentiated especially to osteogenic lineage (both *in vitro* and *in vivo*). New method of hMSC cultivation achieved protection by both Czech (301 148 in 2009) and European patent (EP 1999250, 2011). For further characterization of hMSC grown in v CellGro™, gene expression was studied and overexpression of several genes important for osteogenic differentiation was noted. Growth and osteogenic differentiation of hMSC grown in CellGro™ was better than hMSC grown with FCS in *in vivo* model on polylactide scaffolds in immunodeficient mice. Also, effectivity of hMSC grown in CellGro™ was proven in the model of critical segmental bone defect in immunodeficient rats, where cells applied in plasma clot improved initial new bone formation and vascularization of residual defect. Human MSC survived in the defect for 16 weeks, did not cause any harm to the animals, migration to distant organs was limited and no tumor formation was noted. Unfortunately, hMSC cultivated in CellGro™ were cytogenetically unstable and clonal karyotypic abnormalities were detected in several cultures. Therefore for now, these hMSC are not suitable for clinical trials. It is possible, that observed cytogenetic abnormalities are not clinically significant, however, further research is needed to solve this question.

# 1. Úvod

## 1.1. Historie mezenchymových stromálních buněk (MSC)

Mezenchymové stromální buňky (dříve mezenchymové kmenové buňky, zkratka pro oba termíny je shodná, tj. MSC, v případě lidských mezenchymových stromálních buněk hMSC) byly prvně vypěstovány z kostní dřene v šedesátých letech minulého století sovětským badatelem Alexanderem Friedensteinem jako adherentní kolonie na dně kultivačních láhví po odmytí krvetvorných buněk (**Friedenstein AJ, 1968**). Vzhledem k jejich fibroblastoidní morfologii a neexistujícím lepším metodám charakterizace byly zpočátku nazývány dřevňovými fibroblasty (bone marrow fibroblasts) a rovněž jejich koloniformní jednotky byly nazývány colony-forming units, fibroblast (CFU-F) (**Friedenstein AJ, 1974**), což přetrvalo dodnes (**Colter DC, 2000**). V sedmdesátých letech byly MSC zásadní součástí dlouhodobých adherentních kultur pro pěstování hematopoetických buněk – nejprve myších (tzv. Dexterovy kultury, **Dexter TM, 1974; Dexter TM et al, 1977**), posléze lidských (**Moore MA, 1979; Gartner G, 1980**). Přestože přinejmenším Thomas M. Dexter Friedensteinovy práce znal, chybně pokládal MSC za endotelové buňky, což lze vysvětlit jejich podobnou morfologií a tehdejší neexistencí diagnostických monoklonálních protilátek.

V osmdesátých letech 20. století již bylo jasné, že hematopoetickou podporu poskytují spolu s endotelovými buňkami i buňky mezenchymové a že jejich ovlivněním je možno ovlivnit i jejich schopnost podporovat hematopoezu (**Delwiche F, 1985**). Opět již A. J. Friedenstein sice prokázal, že jednotlivé CFU-F po transplantaci *in vitro* tvoří kost a podporují krvetvorbu (**Friedenstein AJ, 1980; Lurie EA, 1987**), ovšem vzhledem k technickým omezením nemohl provést subklonální experimenty, při kterých by prokázal diferenciaci buněk z jedné CFU-F do různých buněčných linií. K tomu došlo až o dekádu později.

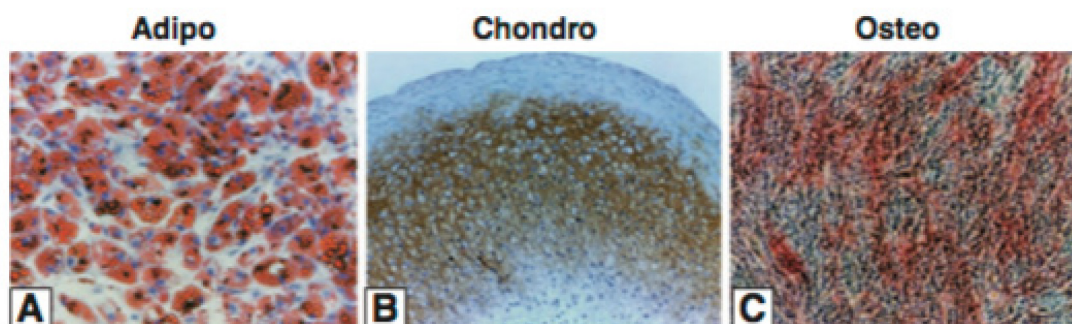
První prací, kde byl použit termín mezenchymové kmenové buňky, byl patrně přehledový článek A. I. Caplana v roce 1991 (**Caplan AI, 1991**). Zde Caplan srovnával MSC z různých embryonálních i dospělých tkání a postuloval myšlenku, že v každé tkáni se nachází populace buněk, zajišťujících jejich sebeobnovu a spekuloval, že tyto buňky by se daly použít k terapeutickým účelům. Tento tzv. "proof of principle" prokázala později práce Horwitzova a Prockopova a Caplanova (**Horwitz MF, 1999**), která zkoumala léčbu pomocí alogenní transplantace kostní dřene u dětí s osteogenesis imperfecta. Po alogenní transplantaci došlo ke zlepšení onemocnění a navíc byly u transplantovaných pacientů zjištěny dárcovské osteoblasty. Že s největší pravděpodobností nejde o přenos zralých osteoblastů, ale skutečně o přenos malého množství MSC, z nichž se osteoblasty teprve diferencují, ukázala již o rok dříve experimentální práce, v níž *ex vivo* namnožené alogenní MSC dokázaly částečně korigovat osteogenesis imperfecta v myším transgenním modelu (**Pereira RF, 1998**). V roce 1992 byla provedena charakterizace MSC pomocí monoklonálních protilátek, která ukázala, že MSC exprimují specifické antigeny SH2 a SH3 (později identifikované jako dva různé epitopy CD73) a Stro-1, které nejsou přítomny na hematopoetických kmenových buňkách a dále že stromální

buňky nejsou schopné diferenciaci do buněk krvetvorných a vice versa (**Haynesworth S, 1992**).

Mimořádně vlivná práce vyšla v roce 1999. Pittenger et al (**Pittenger MF, 1999**) zde prokazuje stabilitu hMSC v tkáňové kultuře a možnost klonování buněk beze ztráty jejich multilineárního diferenciacního potenciálu (tedy v zásadě to, co se Friedensteinovi nepodařilo). Buňky byly pěstovány v klasickém médiu (či klasickým postupem), čímž v dalším textu rozumíme použití běžného kultivačního média (alfa-MEM - alfa minimální esenciální médium, DMEM - Dulbeccoovo modifikované esenciální médium; spolu s 10-20% fetálním telecím sérem [FCS, FBS] a glutaminem). Vyznačovaly se růstem v jedné vrstvě (kontaktní inhibice růstu) a byly pozitivní na SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124 a negativní na markery hematopoetických linií (CD14, CD34, CD45). Byla prokázána schopnost diferenciaci do adipogenní linie (barvení olejovou červení, exprese specifických genů PPAR-gamma a aP2), chondrogenní linie (exprese kolagenu II a IX) i osteogenní linie (akumulace kalcia kolem buněk, barvení alizarinovou červení, exprese osteopontinu a alkalické fosfatázy - **Obr. 1**). Kultivační a diferenciacní protokoly byly v zásadě shodné s těmi, které byly používány předtím (**Gartner S, 1980**) a jsou používány dosud (**Minguel JJ, 2001**).

Pittengerova práce, jakkoli důležitá, vedla k jedné důležité miskoncepti při úvahách o využití MSC v regenerativní medicíně. Vzhledem k možnosti ovlivnění diferenciacních vlastností MSC *in vitro* bylo předpokládáno, že tyto buňky se budou chovat podobně i *in vivo*, kde budou k příslušné diferenciaci vedeny tkáňově specifickými cytokiny. Tato miskoncepce stála za celou řadou neúspěšných klinických studií až do doby, než byla vyvrácena (viz níže). V souvislosti s dlouho známou schopností MSC podporovat hematopoezu se ovšem objevila úspěšná klinická studie (nebo alespoň byla jako úspěšná interpretována), která prokázala účinnost autologních *in vitro* kultivovaných hMSC při obnově krvetvorby po vysokodávkované chemoterapii s podporou autologních krvetvorných buněk (autologní transplantaci - **Koç ON, 2000**).

**Obr. 1 - Pittenger MF, 1999. Diferenciaci MSC do specializovaných buněk. Barvení olejová červení (A), imunohistochemie na kolagen II (B) a alizarinová červení (C).**



Od roku 2000 byly mezenchymové stromální buňky či buňky jim podobné získány z celé řady zdrojů, od dospělých jedinců i z fetálních tkání. Od dospělých jedinců především z tukové tkáně (**Gimble JM, 2007**), endometria (**Schuring AM,**

2011), zubní pulpy (*Gronthos S, 2000*), periferní i menstruační krve (*Villaron EM, 2004; Musina RA, 2008*), slinné žlázy (*Rotter N, 2008*), kůže či předkožky (*Najar M, 2016*) a synoviální membrány (*De Bari C, 2001*). Z fetálních tkání to pak jsou končetinové pupeny (*Jiao F, 2012*), amniová tekutina i amniová membrána (*In 't Anker PS, 2003; Soncini M, 2007*), placenta (*Kmieciak G, 2015*), pupečnicková krev (*Jaing TH, 2014*) i pupečník (*Ding DC, 2015*).

V souvislosti s novými zdroji MSC bylo rovněž zjištěno, že MSC je možno diferencovat nejen do tkání mezodermového původu (kost, chrupavka, tuková tkáň, sval, šlacha), ale i do tkání původu ektodermového (gliové a neurální buňky) či endodermového (hepatocyty, beta buňky Langhansových ostrůvků). Plasticita MSC do určité míry souvisí s jejich původem – blíže viz **kapitola 1.3**. Vzrostl též zájem o imunomodulační schopnosti MSC, které, jak bylo posléze zjištěno, tvoří základ jejich působení, a to i co se týče tkáňové regenerace (*Caplan AJ, 2015*). V souvislosti s novými zdroji hMSC byly hodnoceny diferenciační potenciály a profily genové exprese hMSC získaných z různých tkání (*Silva VA jr, 2003; Panepuci RA, 2004; Via AG, 2012; Li X, 2014; Elahi KC, 2016; Henrich D, 2016*).

Co se týče aplikací v oblasti regenerativní medicíny, byly zkoušeny různé způsoby přípravy a aplikace MSC. Byly pokusy o prediferenciaci MSC do tkáňově specifických prekurzorů *in vitro* před jejich *in vivo* podáním (*Yoon E, 2007; Ye X, 2012*), hodně prací se zabývalo a zabývá přípravou různých scaffoldů (termín přibližně přeložitelný jako lešení), na nichž by bylo možno MSC předpěstovat s cílem vložení celého komplexního produktu tkáňového inženýrství do místa orgánového defektu (*Warren SM, 2004; Ciapetti G, 2012; Michel J, 2016*). Vzhledem k tomu, že tyto postupy byly limitovány omezenou migrací hMSC do scaffoldů a omezenou difusí živin a kyslíku do vrstvy MSC, která nemohla být silnější než 1 mm, byly vyvíjeny postupy, jak MSC na scaffoldy účinněji nasadit (*Takahashi Y, 2004; Knight RL, 2005; Yamanaka K, 2015*), případně jak vytvářet komplexnější trojrozměrné struktury (MSC sferoidy - *Suenaga H, 2015*) či tkáň tvořené několika typy buněk, včetně endotelových. *In vitro* produkci komplexnějších tkání umožnily buněčné tiskárny, které umožňují i tištění na scaffoldy nebo nasazování buněk do různě definované extracelulární matrix (*Snyder J, 2015; Yoon E, 2016; Mandrycky C, 2016*). Objevení nového mechanismu působení MSC jako sekretorických buněk, produkujících růstové faktory a cytokiny (*Iyer SS, 2008; Meirelles Lda S, 2009; Via AG, 2012*) vedlo ke způsobům, které umožňují tuto tvorbu usměrnit, ať již jde o vnesení konstitutivně exprimovaných genů (např. pro BMP-2 v případě kostní regenerace - *Peterson B, 2005*) nebo o polarizaci do různých fenotypů (*Waterman RS, 2010*). Není ovšem třeba zdůrazňovat, že tyto moderní postupy druhé či třetí generace jsou prováděny pouze jako preklinické experimenty a jejich využití v klinice rozhodně není na pořadu dne – možná je dnes ještě vzdálenější, než jsme si mysleli před deseti či patnácti lety. Klinické studie vesměs využívají hrubých hMSC přípravků první generace (čímž myslím přípravu MSC klasickým způsobem, ev. s využitím lidské plazmy obohacené o destičkové růstové faktory místo FCS - *Bieback K, 2009*), a to jednak proto, že do jejich vývoje bylo vloženo již příliš mnoho investičních prostředků, jednak z důvodů regulačních, neboť čím složitější

produkt, tím je jeho schválení regulačními agenturami složitější a možnosti jeho využití omezenější.

## 1.2. Charakterizace mezenchymových stromálních buněk

### 1.2.1. Původ mezenchymových stromálních buněk

Fyziologicky jsou prekurzory mezenchymových buněk přítomny v perivaskulární oblasti malých cév jako tzv. pericyty (**Crisan M, 2008**), ze kterých vznikají jako reakce na poškození či zánět stromální buňky. Pericyty více či méně (**Vezzani B, 2016**) odpovídají kultivačním artefaktům označovaným jako MSC (tj. buňkám vykultivovaným *in vitro*), avšak reagují přímo na problémy vzniklé v jejich blízkosti. Produkci cytokinů a trofických faktorů pak:

- inhibují ischemií indukovanou apoptózu,
- inhibují tvorbu jizevnaté tkáně,
- stimulují vaskulogenezu,
- stimulují mitózu orgánově specifických prekurzorů (**Caplan AI, 2006; Caplan AI, 2011**).

Tyto mechanismy účinku jsou výrazně odlišné od původní představy ohledně jejich regenerativních schopností, jak bude pojednáno dále. Zkratka "MSC" se tímto dostalo nového významu: Medicinal Signalling Cells (**Caplan AI, 2015**).

### 1.2.2. Definice mezenchymových stromálních buněk

Po roce 2000, kdy se jako zdroje MSC začaly prosazovat jiné tkáně než krvetvorná dřev, bylo nutno definovat společné vlastnosti (minimální kritéria), která umožní určit, která buňka je mezenchymová kmenová buňka a která nikoli. Toto bylo definováno v konsenzu Mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii (**Dominici M, 2006**), kdy byly jako MSC definovány buňky, které se vyznačují:

- adhezí k plastu,
- exprimují znaky CD73, CD90, CD105 a přitom neexprimují znaky hematopoetických linií (CD14, CD34, CD45) ani HLA-DR antigen,
- jsou schopné diferenciaci minimálně do adipogenní, chondrogenní a osteogenní linie.

Současně bylo v tomto konsenzu doporučeno používat místo názvu mezenchymové kmenové buňky název mezenchymové stromální buňky (zkratka MSC zůstává stejná pro oba výrazy).

V průběhu dalšího vývoje došlo k jistým otázkám ohledně této definice, zejména co se týče exprese CD34 antigenu (je exprimován čerstvě izolovanými buňky stromální vaskulární frakce tukové tkáně, ale ztrácen při následné kultivaci (**Scherberich A, 2013**), ale k dalšímu upřesnění těchto kritérií dosud nedošlo.

### 1.2.3. Kultivace mezenchymových stromálních buněk a jejich chování v buněčné kultuře

Vzhledem k tomu, že pericyty jsou přítomny ve všech vaskularizovaných tkáních, lze předpokládat, že i MSC je možné získat odkudkoli. Toto se do značné míry potvrdilo, jak uvedeno v kapitole 1.1. Jako zdroj MSC se osvědčily zejména tkáně, které:

- jsou snadno přístupné, a/nebo:
- obsahují velká množství MSC, a/nebo:
- získané MSC mají specifické vlastnosti, většinou výraznou schopnost expanze a nadprůměrnou plasticitu.

Vzhledem k nemožnosti pokrýt celou tuto oblast se zaměříme pouze na způsob získávání a kultivaci buněk z kostní dřevě, s přihlédnutím k buňkám z adipozní tkáně (tzv. adipose derived stem cells, ADSC). K ostatním jen dvě poznámky: Fetální tkáně se oproti dospělým vyznačují obecně vyšší proliferací a větší plasticitou, z dospělých tkání se pak vlastnostmi vydělují buňky získané ze zubní pulpy, které nepocházejí z mezodermy, ale neurální rýhy a z tohoto důvodu se dobře diferencují do neurálních buněk (**Vollner F, 2009; Wang J, 2010**).

Jak již dříve uvedeno, tradičním zdrojem MSC je kostní dřevě, kde byly ostatně i objeveny. MSC z kostní dřevě rovněž představují standard, s nímž jsou porovnávány vlastnosti MSC z jiných tkání, zejména jejich schopnosti růstu, diferenciaci, imunomodulace a též jejich profily genové exprese (**Panepucci RA, 2004; Tsai MS, 2007; Li X, 2014; Elah KC, 2016**). U malých zvířat (myši, krysy) se kostní dřevě získává výplachem dlouhých kostí, především femurů, u člověka a jiných velkých savců (psi, prasata, ovce, koně) se získá aspirací ze dřevě dutiny velkých kostí. Aspirát by se měl správně označovat termínem kostní krev, tj. jaderná frakce kostní dřevě a dřevě trámečky smísené s periferní krví, z níž se následně centrifugací na Ficollu či jiném sacharidovém gradientu získá buffy coat (koncentrovaná jaderná frakce bez erytrocytů a dřevě trámeček). Buňky z buffy coatu (tzv. BMMC – bone marrow mononuclear cells) jsou pak nasazeny do kultivačního média v plastových miskách či láhvích a neadherentní frakce je odmyta za 24-72 hodin po nasazení (**Caterson EJ, 2002**).

Celkově je možno vývoj kultur hMSC charakterizovat podobným způsobem jako vývoj ostatních kultur nenádorových lidských buněk. Po tzv. lag fázi (24-48 hod), v průběhu které probíhá přizpůsobování buněk kultivačním podmínkám následuje exponenciální fáze růstu. U hMSC získaných z kostní dřevě dochází po úvodním nasazení adherentních buněk na plast ke vzniku konfluentní či semikonfluentní vrstvy (90-95% pokryvu kultivační nádoby) zhruba za 2-4 týdny po nasazení, což je delší doba než např. u tukové tkáně, kdy ke konfluenci dochází již po 10 dnech (**Musina RA, 2005; Musina RA, 2007**), ale kratší než u placentálních buněk, kdy ke konfluenci dochází během 2 měsíců. Toto může být způsobeno vyšší expresí genů spojených z buněčným cyklem u původně rychleji rostoucích buněk nebo i tím, že v již při úvodní izolaci může být určité procento hMSC senescentních (**Wagner W, 2005; Ksiazek K, 2008**). Každopádně, tato

fáze se nazývá fáze plateau, kdy buňky již dále nerostou. Za této situace je možno buňky sklídit a použít k dalším experimentům, nebo je rozdělit do subkultur (většinou obsah jedné kultivační nádoby se dělí do 3-5 nádobek – **Soukup T, 2006**). Lidské buňky však není možno tímto způsobem kultivovat donekonečna, protože jsou schopné pouze cca 40-50 kultivačních dělení (tzv. Hayflickův limit, Poté přichází tzv. fáze senescence, kdy buňky získávají plachtovitou, často lamelovanou morfologii, jádro má místo několika jadérek jen jedno, často centrálně uložené a vyskytují se vícejaderné buňky. Senescentní buňky ztrácejí schopnost dalšího dělení a zanikají apoptózou. Pokud se tyto buňky dále dělí, dochází ke vzniku aneuploidií a buňky často končí svůj život mitotickou katastrofou (**Estrada JC, 2013**). Druhou možností je, že u jedné či více senescentních buněk dojde k tzv. transformaci, vzniku nesmrtelného a v zásadě nádorového klonu. Pravděpodobnost transformace je závislá na typu živočicha (u malých zvířat k ní dochází častěji), ale též na typu tkáně, z níž je kultura odebrána. Transformace je poměrně častá u kultur lidských epitelových buněk z prsní žlázy, poněkud méně pravděpodobná u fibroblastů téhož původu, zatímco v lidských mezenchymových buňkách se prakticky nevyskytuje (**Romanov SR, 2001; Bernardo ME, 2007**). Senescentní buňky kromě schopnosti dělení ztrácejí i schopnost diferencovat se do specializovaných linií a imunosupresivní schopnosti (**Kziasek K, 2009**). **Proliferativní** senescenci je možno oddálit pěstováním buněk v hypoxických podmínkách nebo přidáním destičkového lyzátu či přímo růstových faktorů FGF-2 či PDGF (**Ito T, 2007; Tsai CC, 2011; Griffiths S, 2013; Zhang JM, 2016**).

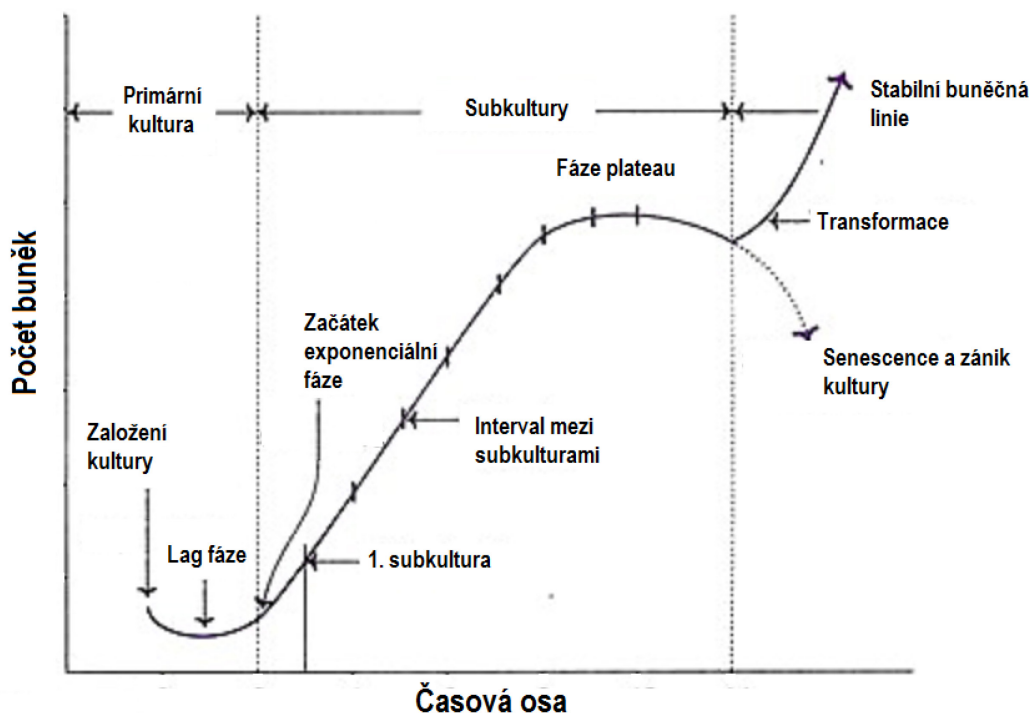
Výše popsany vývoj buněčné kultury je schematicky zachycen na **Obr. 2**. Na **Obr. 3** jsou pak zobrazeny kultury mezenchymových stromálních buněk kultivované klasickým způsobem (alfa-MEM + FCS) v různých fázích včetně počínající senescence.

Co se týče výtěžku hMSC získávaných různými způsoby a rychlosti jejich kultivace, nacházíme ve starší literatuře pouze kusé, nesystematicky zpracované údaje. Je nutno rovněž mít na paměti, že některé kultivační metody vyvinuté komerčními firmami nebyly zveřejněny a nad deklarovanými výtěžky jejich metod nezasvěcený člověk jen vrtí hlavou.

V krátkosti lze říci, že konečný výtěžek hMSC souvisí s věkem dárce, odebíranou tkání, způsobem odběru materiálu (u kostní dřevě je více malých porcí lepších než jedna velká porce – **Muschler GF, 1997**), dále na hustotě nasazení a kompozici média. Vzhledem k tomu, že naše studie probíhaly s buňkami získanými z kostní dřevě, budeme se věnovat především jim.

Zásadní důležitost má hustota nasazení. Historicky bylo postulováno, že buňky potřebují určitou minimální hustotu k tomu, aby byly schopné proliferovat (**Zhu H, 2004**). Co se týče MSC, van den Bos kdysi stanovil tuto hustotu na 5000 BMMC/cm<sup>2</sup> (**van den Bos C, 1998**). To se ovšem ukázalo jako příliš vysoké číslo a další práce tuto hustotu stanovily na 50-1000 BMMC/cm<sup>2</sup> (**Sekiya I, 2002; Sotiropoulou PA, 2006**). Bylo zjištěno, že po

Obr. 2 – obecná schéma vývoje buněčné kultury (včetně subkulturací)



nasazení BMMC v množství 1000 BMMC/cm<sup>2</sup> jsou MSC schopné zhruba 30-násobné expanze, zatímco v množství 50 BMMC/cm<sup>2</sup> je expanze až 500-násobná (*Sekiya I, 2002*). Ještě dál zašel Colter (*Colter DC, 2000*), který při velmi nízké denzitě (1.5-3 BMMC/cm<sup>2</sup>) dosahoval až 2000-násobné expanze. Na druhou stranu je pochopitelně nutno vzít do úvahy, že z hlediska absolutního počtu je množství MSC získané při denzitě nasazení 1000 bb/cm<sup>2</sup> vyšší než při nasazení při extrémně nízkých denzitách, jak vyplývá z prosté trojčlenky. Jinou otázkou je kvalita buněk, získaných při různých počtech nasazených BMMC.

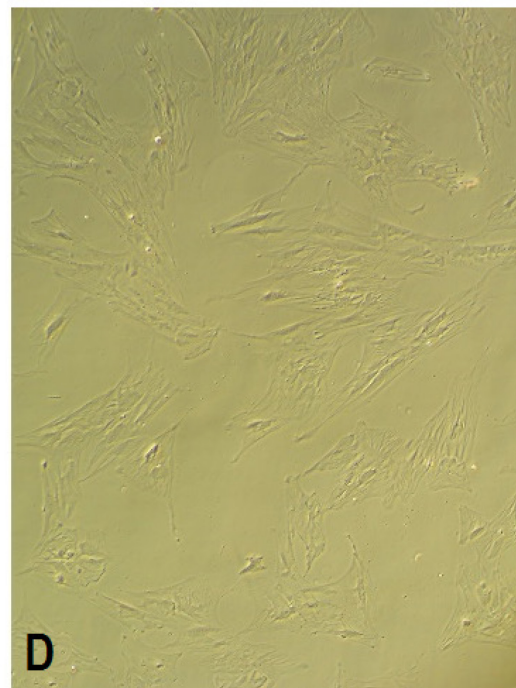
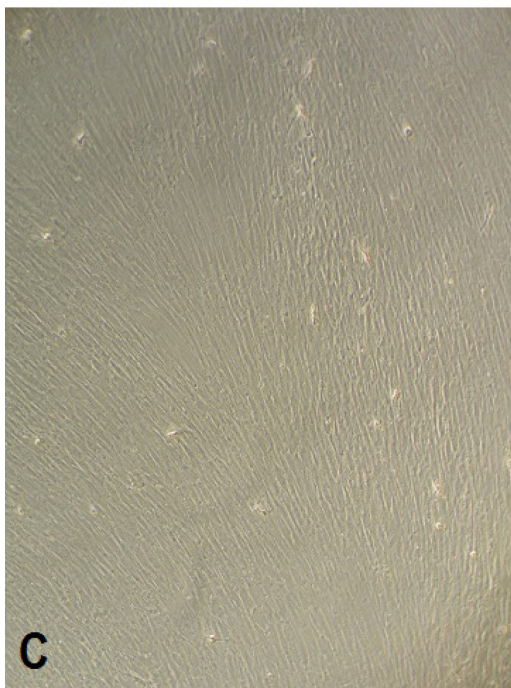
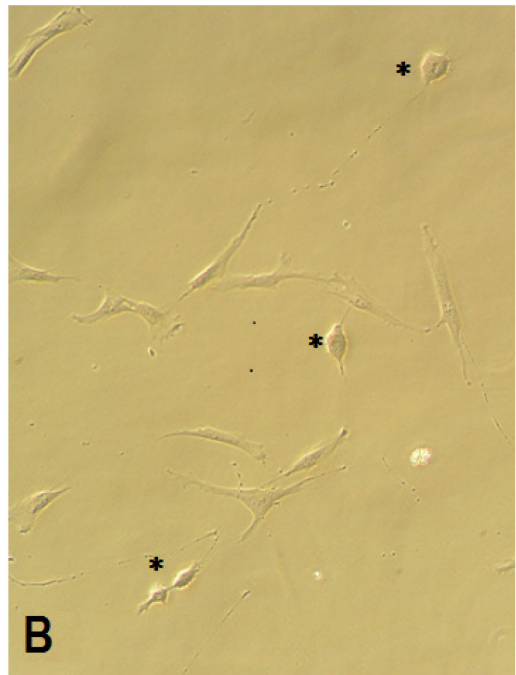
Důležitý je i výběr séra. Ve způsobu kultivace, kterou jsme výše nazvali "klasickou", je užíváno FCS v 10-20% koncentracích (*Meuleman N, 2006; Kosmacheva SM, 2008*). Pro optimální účinnost FCS je nutné testovat různé šarže, což je časově i finančně náročné (*Shahdadfar A, 2005*). Bezsérová média jsou sice k dispozici, ale používají nepublikované kombinace syntetických suplementů a růst MSC v těchto médiích je jen marginálně lepší než v médiích s FCS (*Meuleman N, 2006*). Pochopitelně, tato média jsou rovněž násobně dražší. Výrazných úspěchů bylo získáno při použití lidského destičkového lyzátu, který obsahuje řadu růstových faktorů. 5% destičkový lyzát je lepší než 10% FCS (*Capelli D, 2007*). Destičkový lyzát se tak patrně stane novým "zlatým standardem" při přípravě hMSC pro klinické účely.

Další důležitou otázkou je eventuální užití cytokinů. Bylo identifikována celá řada cytokinů, která buď povzbuzuje nebo brzdí růst MSC (**Tab 1**). Vliv různých kombinací na proliferaci hMSC byl publikován pouze zřídka (*Gronthos*



S, 1995), bezesporu však tyto otázky byly zkoumány velmi bedlivě a získané poznatky byly použity pro přípravu komerčně užívaných suplementů.

**Obr. 3 - vývoj buněčné kultury hMSC z kostní dřeně kultivované v alfa-MEM s fetálním telecím sérem. A - primokultura 4. den po nasazení, jednotlivé vřetenité buňky. B - jiná primokultura 4. den po nasazení, patrné jsou četné mitózy (označeny hvězdičkou). C - konfluentní primokultura den 15 po nasazení. D - 3. subkultura tvořená převážně senescentními buňkami (plachtovitý tvar, lamelování). Nepublikovaný obrázek.**



**Tab. 1 – vliv různých cytokinů na proliferaci hMSC z kostní dřene**

<b>Cytokin</b>	<b>Efektivní dávka</b>	<b>Proliferační efekt</b>	<b>Odkaz</b>
IL-3	10 ng/ml	zvyšuje	<i>Kziasek K, 2009</i>
IL-17	50 ng/ml	zvyšuje	<i>Huang W, 2006</i>
EGF	10-100 nM	zvyšuje	<i>Tamma K, 2006</i>
FGF-2	3 ng/ml	zvyšuje	<i>Solchaga LA, 2005</i>
FGF-4	30 ng/ml	zvyšuje	<i>Quito FL, 1996</i>
FGF-8	50-100 ng/ml	zvyšuje	<i>Valta MP, 2006</i>
HB-EGF	5-50 ng/ml	zvyšuje	<i>Krampera M, 2005</i>
HGF	20 ng/ml	snižuje	<i>Forte G, 2006</i>
IGF-1	100 ng/ml	zvyšuje	<i>Longobardi L, 2006</i>
M-CSF	25 ng/ml	zvyšuje	<i>Jing-Xiang F, 2004</i>
PDGF	0.4 nM	zvyšuje	<i>Fekete N, 2014</i>
TGF-beta1	5 ng/ml	snižuje	<i>Heldin CH, 2009</i>
TGF-beta2	10 ng/ml	snižuje	<i>Heldin CH, 2009</i>
VEGF	10 ng/ml	zvyšuje	<i>Ponts J, 2008</i>

Vzhledem k narůstající popularitě MSC získaných z tukové tkáně věnujme alespoň odstavec i jim. Tuková tkáň je získávána především liposukcí. Velikost vstupního materiálu je s kostní dřevou nesrovnatelná (může jít třeba o půl kilogramu tkáně nebo i více). Po očištění materiálu v PBS (někdy s antibiotiky) proběhne homogenizace vzorku: nařezání skalpelem a opakované pipetování. Homogenizát je pak tráven 0.075% roztokem kolagenázy typu I v PBS po dobu 30 minut při 37°C. Kolagenáza se neutralizuje přidávkem alfa-MEM s 20% tepelně inaktivovaným telecím sérem a znovu proběhne pipetování k dezintegraci zbývajících tukových agregátů. Vzorek je potom několikrát centrifugován (2000 rpm po 5 min), aby se oddělily tukové buňky (svrchní frakce) a tzv. stromální vaskulární frakce (SVF), která vytvoří peletu na dně zkumavky. SVF je opět homogenizována a posléze přefiltrována přes 70 um filtr. Další kultivace probíhá podobně jako u BM-MS (Bunnell BA, 2008). Opět, obsah ADSC ve stromální vaskulární frakci je nesrovnatelný s obsahem MSC v kostní krvi (3-7% v. 0.01-0.1%). Vzhledem k velkému množství vstupního vzorku a velkému množství MSC v SVF je možno používat tyto buňky k terapeutickým účelům i bez kultivace (tzv. čerstvě izolované kmenové buňky z tukové tkáně - Algarbi Z, 2014). Získávání čerstvě izolovaných ADSC bylo rovněž automatizováno pro podmínky správné výrobní praxe (Fraser JK, 2014).

### 1.3. Diferenční schopnosti mezenchymových stromálních buněk *in vitro*

#### 1.3.1. – Mezodermální tkáň

Vzhledem k tomu, že MSC pocházejí z mezenchymální linie, není velké překvapení, že jsou schopné diferencovat do mezodermálních tkání. U původně izolovaných MSC z kostní dřevy se pokládalo za logické, že se dokázaly diferencovat do osteoblastů a chondroblastů (hojení kosti), i do adipocytů (náhrada krvetvorné tkáně tkání tukovou u starších jedinců). Z pohledu logiky

není jasné, proč by se měly hMSC diferencovat do svalových buněk (kardiomyocytů, příčně pruhovaných i hladkých svalů), což je ovšem vysvětlitelné využíváním hypometylačních agens pro tyto účely (viz dále).

Klasicky se pro účely diferenciaci (nejen do mezodermových řad) používají suplementy do růstových médií, které ovšem většinou navozují nefyziologické diferenciacní podmínky. Průkazy diferenciaci se pak provádějí funkčně (akumulace kalcia, elektrická dráždivost svalových buněk) a expresí genů typických pro příslušné tkáně.

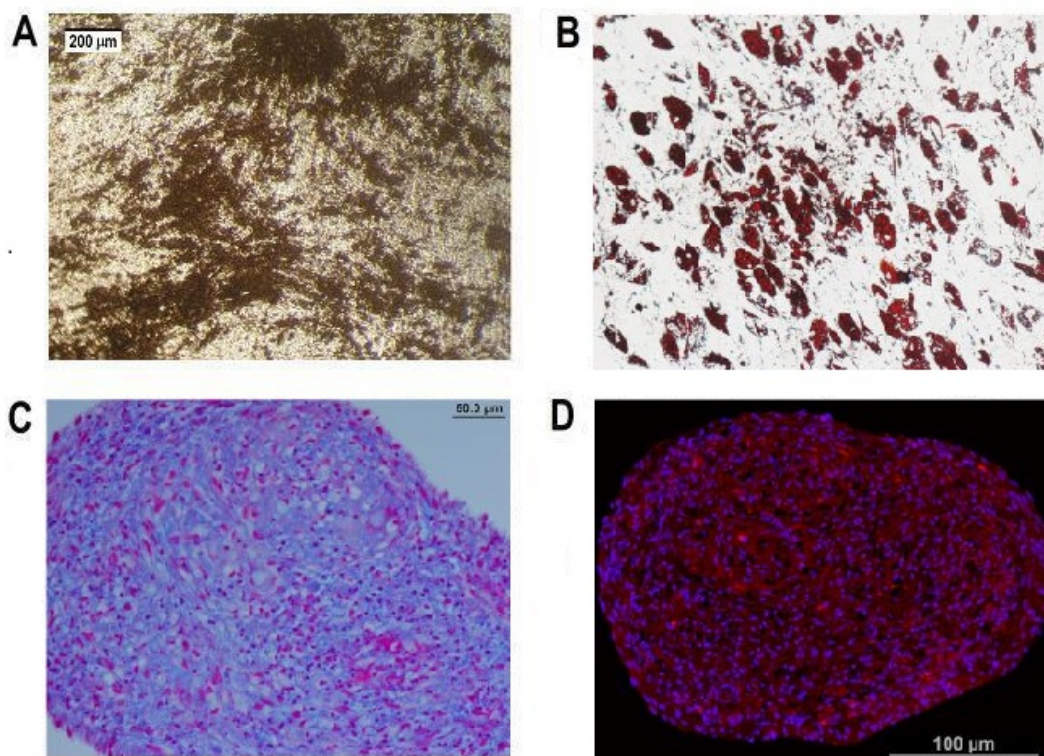
Diferenciaci do osteogenní linie je prováděna přidáním dexamethasonu, kyseliny askorbové a beta-glycerolfosfátu do kultivačního média (**Caterson EJ, 2002; Muruganandan S, 2009**). Proces trvá 3-4 týdny, po kterých se zjišťuje mineralizace kultury pomocí von Kossa barvení (**obr. 4A**) nebo pomocí barvení alizarinovou červení. Osteoblastická diferenciaci probíhá několika stádii, přičemž pro časné stadium je důležitá exprese runt-related transkripčního faktoru 2 (Runx2 – **Neve A, 2011**). V dalších fázích jsou exprimovány další transkripční faktory jako osteopontin nebo kostní morfogenický protein 2 (BMP-2), který sám o sobě může diferencovat hMSC do osteogenní (**Dorman LJ, 2012**), ale v některých situacích i do adipogenní linie. Genem exprimovaným v terminálním stadiu diferenciaci je alkalická fosfatáza (ALP), jejíž genovou expresi je možno měřit pomocí PCR nebo stanovovat hladinu enzymu v kultivačním médiu biochemicky. Zajímavé, avšak logické je, že osteogenní a adipogenní diferenciaci jsou mutuálně exkluzivní (**Kang Q, 2009**).

Diferenciaci do adipogenní linie probíhá ve dvou fázích: první fáze je determinační a druhá terminálně diferenciacní (**Muruganandan S, 2009**). Pro diferenciacní účely se používá třítydenní kultivace v médiu suplementovaném inzulinem, dexamethasonem, indomethacinem a isobutylxanthinem (**Caterson EJ, 2002**). Během determinační fáze zachovávají preadipocyty fibroblastický vzhled, v terminální fázi pak akumulují tukové kapénky, které jsou prokazatelné olejovou červení (**obr. 4B**). Determinační a diferenciacní fáze je někdy navozována i sekvenčním protokolem, kde se střídá indukční médium a diferenciacní médium. Jiným způsobem adipogenní diferenciaci je použití antidiabetika rosiglitazonu (**Contador D, 2015**) spolu s dexamethasonem. Tato metoda je s výhodou používána při diferenciaci prasečích MSC, na které klasické diferenciacní médium nefunguje (M. Kalbáčová, personální komunikace). Specificky exprimovanými geny pak jsou peroxizomovým proliferátorem aktivovaný receptor gamma (PPAR gamma), adipocytový protein 2 (aP2) a lipoproteinová lipáza (LPL – **Pittenger MF, 1999; Rosen ED, 2006**).

Chondrogenní diferenciaci používá různých koktejlů, v nichž hraje prominentní roli transformující růstový faktor beta (TGF-beta, většinou isoforma TGF-beta1 či TGF-beta3). Dále se používá inzulin-transferrin-selenium (ITS), kyselina linolenová, askorbát a dexamethason (**Mackay AM, 1998; Pittenger MF, 1999; Caterson EJ, 2002**). Klasicky se používá 3D kultivace v hypoxickém prostředí, v kónické zkumavce a v médiu bez suplementace sérem, ale jsou i protokoly pro dvourozměrnou chondrogenní diferenciaci (**Khanmohammadi M, 2012**). Kromě klasického protokolu je možno použít i protokoly

s parathormonem (*Zhang Y, 2104*), či inzulínu podobným růstovým faktorem I (IGF-I) spolu s BMP-2 (*An C, 2010*). V průběhu chondrogenní diferenciace je produkován kolagen II, který je možno prokázat pomocí PCR (genová exprese) či imunohistochemicky po vytvoření histologických řezů chrupavčitých agregátů (**obr. 4C, D**).

**Obr. 4 – Pytlík R, 2009. Diferenciace hMSC kultivovaných v CellGro™ s lidským sérem a suplementy. A – osteogenní diferenciace, Von Kosoovo barvení, 100x. B – adipogenní diferenciace, barvení olejovou červení, 100x. C – chondrogenní diferenciace, alcianová červeň, 200x. D – imunofluorescenční barvení na kolagen II. Kolagen II – barvení Cy3 (červeně), buněčná jádra barvení DAPI (modře).**



Před dvaceti lety bylo zjištěno, že mezenchymové kmenové buňky se diferencují do svalových buněk po přidání 5-azacytidinu (*Wakitani S, 1995*). Svalově diferencované buňky exprimovaly svalově specifické proteiny jako je těžký řetězec myozinu beta (beta-myozin heavy chain), alfa-srdeční aktin a desmin a byly schopné synchronizované kontrakce v buněčných kulturách. Později byly specifikovány protokoly pro diferenciaci buněk do kardiomyocytů (*Xu W, 2004*), kosterních svalů (*Narita Y, 2008*) i hladké svaloviny (*Haghighipour N, 2012*). Na druhé straně bylo zjištěno, že ve fyziologických podmínkách se MSC do svalů nediferencují, i když zlepšují vaskulogenezu a hojení poškozeného svalu (*Uezumi A, 2014*). V současné době již není svalová diferenciace MSC tak překvapivá, protože jednak známe jejich pericytový původ (*Crisan M, 2008*) a tudíž jejich úlohu ve vývoji cévní stěny, jednak víme, že 5-azacytidin je demetylační agens, které je schopné odstraněním metylových skupin genových promoterů umožnit transkripci spících genů, a to nejen svalově specifických, ale i osteoindukčních (*Zhou GS, 2009; Supokawej A, 2013*).



Specifické (nenáhodné) demetylace diferenciačních genů je využíváno i terapeuticky, jmenovitě v maligní hematologii (**Buckstein R, 2011**).

### 1.3.2. – Ektodermální tkáň

Extenzivně byla zkoumána schopnost diferenciaci MSC do buněk nervové tkáně. Budiž rovnou řečeno, že jde o nejkontroverznější položku mezi diferenciačními schopnostmi MSC. Logická je schopnost neurogení diferenciaci u MSC ze zubní pulpy, protože tyto buňky pochází z neurální lišty (**Vollner F 2008; Wang J, 2009**), zde bylo dokonce postulováno, že MSC ze zubní pulpy myši, které se vzápětí diferencují do odontoblastů, ve skutečnosti pocházejí z neuroglií (**Kaukua N, 2014**). Nicméně i MSC z jiných tkání byly diferencovány v cholinergní či dopaminergní neurony za pomoci růstových faktorů (fibroblastový růstový faktor - FGF, epidermální růstový faktor - EGF, hepatocytární růstový faktor - HGF, gliální neurotrofický růstový faktor - GDNF, mozkový neurotropický faktor - BDNF, **Safford KM, 2002; Naghdi M, 2009; Datta I, 2011**) i faktorů chemických (retinová kyselina, 5-azacytidin, isobutylmetylxanthin, indomethacin (**Pavlova G, 2012**)). Astroglie rovněž podporovaly diferenciaci MSC do neuronů (**Chu Q, 2008**), na druhou stranu transplantace MSC spolu s gliovými buňkami neměly synergistický efekt při léčbě míšního poranění u potkanů (**Amemori T, 2010**). Nelze však pominout ani skeptické hlasy. Někteří autoři uvádějí, že neurálně diferencované MSC nejsou skutečnými neurony, ale pouze exprimují neurální markery (**Rooney GE, 2009**), z nichž některé (nestin, enoláza2, MAP1b) jsou detekovatelné i v nediferencovaných MSC kulturách (**Tondreau T, 2004**). Co se týče konkrétně nestinu, ten je navíc exprimován i v končetinových pupenech, v myoblastech v průběhu svalové regenerace a epitelových buňkách, navíc nestin-pozitivní populace MSC se pohotověji diferencuje do kosterního a svalového svalstva *in vitro* a zlepšuje hojení myokardu *in vivo* (**Shiota M, 2007**). Nabývání tvaru "nervových buněk" v kultuře je způsobeno změnami v cytoskeletu a nikoli tvorbou funkčních dendritů (**Neuhuber B, 2004**). Přestože bylo publikováno zapojení MSC do funkčních neurosfér (**Wislet-Gendebien S, 2005**) a schopnost tvorby synapsí včetně evokace akčních potenciálů, nebylo prokázáno, že synaptický přenos by se odehrával pomocí neurotransmitterů. Navíc akční potenciály byly neobyčejně slabé a nebylo možno je vyvolávat rychle a opakovaně (**Cho KJ, 2005; Wislet-Gendebien S, 2005**). Schopnost MSC chránit či regenerovat nervovou tkáň v různých zvířecích modelech je plně vysvětlitelná jejich imunomodulačním působením (**Urdzíková LM, 2014**) a sekrecí trofických faktorů, jako je vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), fibroblastový růstový faktor (FGF-2), epidermální růstový faktor (EGF), neurotrophin-3 (NT3), HGF a BDNF (**Wilkins A, 2009, Wang F, 2010**).

### 1.3.3. – Endodermální tkáň

Na rozdíl od kontroverzní neurální diferenciaci je diferenciaci MSC do hepatocytů a pankreatických beta buněk vesměs přijímána jako fakt, i když u hepatocytů rovněž nelze předpokládat, že by šlo o plnohodnotné buňky, suficientní pro klinické použití. Hepatocyty se diferencují z MSC pomocí dvou

kroků: diferenciaci se dosahuje podáním EGF, FGF-2 a nikotinamidu v průběhu jednoho týdne. Maturace je dosahována pomocí onkostatinu M, dexamethasonu a ITS (**Lee KD, 2004; Stock P, 2014**). Takto diferencované buňky exprimují tkáňově specifické markery jako je albumin, alfa-fetoprotein a zejména transkripční faktor jaderný hepatální protein 4 alfa (HNF-4alfa - **Parvi F, 2003**). Čím je tohoto faktoru více (využívá se např. transfekce genem pro tento protein – **Hang H, 2014**), tím je diferenciaci lepší. Dalším zkoumaným diferenciacním faktorem je valproová kyselina, působící přes dráhy proteinové kinázy B (AKT) a extracelulárními signály regulovaných kináz (**An SY, 2014**). Je ovšem nutno podotknout, hepatocyty se mnohem lépe diferencují z indukovaných pluripotentních buněk (iPSC - **Wu YM, 2016**).

Lidské MSC z různých tkání (kostní dřev, tuk, zubní pulpa, amniová tekutina, pupečníkové a placentární tkáň – **Criscimanna A, 2012; Kim J, 2012; Kanafi MM, 2013**) se podařilo úspěšně diferencovat v beta buňky pankreatu, které produkují inzulin *in vitro* a korigují hyperglykémii po transplantaci do myši, kterým byly vlastní beta buňky zlikvidovány streptozocinem (**Tang DQ, 2012; Gabr MM, 2013**). Diferenciaci MSC do beta buněk je dosahováno buď parakrinními a růstovými faktory přítomnými v pankreatickém prostředí (**Phandis SM, 2011**) nebo chemicky aktivním A, butyrátem sodným, taurinem a nikotinamidem (buňky zubní pulpy, **Govindasamy V, 2011**). Bohužel se zdá, že hMSC diferencované do beta buněk mohou podlehnout maligní transformaci v dlouhodobé kultuře (**Tang DQ, 2012**).

## 1.4. Mechanismy působení mezenchymových stromálních buněk *in vivo*

### 1.4.1. – základní předpoklady

Na začátku 21. století se předpokládalo, že MSC působí na regeneraci tkáňe třemi mechanismy:

- proliferací a transdiferenciací,
- fúzí se specializovanými buňkami poškozeného orgánu,
- sekrecí chemokinů, cytokinů a růstových faktorů.

V průběhu dalšího výzkumu se ukázalo, že hlavní roli, přinejmenším u člověka, hraje třetí mechanismus. Proliferace a transdiferenciaci hrají podružnou úlohu a fúze patrně úlohu zanedbatelnou. Přesto se o všech třech mechanismech zmíníme, protože i výzkum transdiferenciaci a fúze *in vivo* přispěl k našemu pochopení regeneračních mechanismů poškozených tkání a také proto, že experimentální modely, které se zdály tyto koncepty potvrzovat, nebyly zásadně špatné. Pouze se nepočítalo s tím, že lidské hMSC se již svými základními vlastnostmi tolik odlišují od MSC jiných savců (**Javazon EH, 2001**). Dále je třeba mít na paměti, že kostní dřev, jejíž transplantace poprvé ukázaly na regenerační potenciál kmenových buněk i pro léčbu jiných onemocnění než jsou poruchy krvetvorby, obsahuje kromě MSC i krvetvorné kmenové buňky (HSC), které rovněž mohou transdiferencovat do jiných tkání. Vzájemný podíl HSC a

MSC v regeneraci nehematopoetických orgánů po alogenní transplantaci kostní dřeně je nejasný (*Catacchio I, 2013*).

Způsob, jakým MSC podporují krvetvorbu, je svým způsobem unikátní. Pověšinou rovněž zahrnuje chemotaktické a trofické působení, avšak nikoli v dualitě MSC-krvetvorná buňka, ale v rámci tzv. hematopoietické niche (*Calvi LM, 2015*). Tomu bude věnována zvláštní podkapitola.

Předpokladem pro regeneraci tkání jakýmkoli mechanismem je úspěšné zachycení (homing) a retence kmenových buněk v poškozené tkáni. MSC je možno podat buď systémově (nejčastěji v intravenózní, eventuálně intraarteriální infuzi, ale i intraperitoneálně či podkožně - *Gao J, 2011; Devine SM, 2003; Israel M, 2003; Francois S, 2006; Meyerrose TE, 2007*) nebo lokálně. Lokální podání pak může být ve formě suspenze buněk injekčně aplikovaných do poškozené tkáně (*Hao C, 2016*) nebo na buněčných lešeních, scaffoldech (*Yoon E, 2007; Liu G, 2010; Chen W, 2013*).

Systémové podání MSC hlodavcům vedlo k preferenčnímu homingu hMSC v plicích, játrech, ledvinách a slezině a výsledky byly podobné, ať již se jednalo o alogenní krysí model (*Gao J, 2001*) nebo xenotransplantáty hMSC do imunodeficientních myší (*Devine SM, 2003; Israel M, 2003; Francois S, 2006; Meyerrose TE, 2007*). Zadržování infundovaných hMSC v plicích bylo možno částečně zablokovat současným podáváním vazodilatancí v době infuze MSC (*Gao J, 2001*). V Meyerroseho práci (*Meyerrose TE, 2007*) nebyl pozorován rozdíl v distribuci hMSC podaných intravenózně, intraarteriálně, intraperitoneálně či subkutánně: nejvíce lidských buněk bylo nalezeno v plicích (37/10 000 krysích buněk) a ve slezině (15/10 000), v ostatních orgánech byly nalezeny nejvýše jednotky lidských buněk na 10 000 krysích a ve skeletálním systému byl poměr pouze 0.75/10 000. Dále bylo zjištěno, že celotělové ozáření zlepšuje přihojení hMSC v xenogenním myším modelu a že dodatečně lokalizované ozáření může výrazně ovlivnit distribuci hMSC v organismu (*Francois S, 2006*). V případě lokálního poškození byl rovněž pozorován preferenční homing do této oblasti, ovšem ve výrazné závislosti na způsobu podání (zde v modelu experimentálního infarktu myokardu muselo být podání hMSC intraventrikulární, nikoli intravenózní - *Israel M, 2003*).

## 1.4.2. Transdiferenciace

Zatímco v kapitole 1.3. jsme se zabývali možnostmi diferenciaci MSC *in vitro*, zde se budeme zabývat transdiferenciací *in vivo*, ať již za pomoci nativních MSC, tak za pomoci MSC *in vitro* prediferenciovaných. Je nutno uvést, že zatímco v některých případech se pod pojmem "transdiferenciace" rozumí diferenciaci MSC do jakýchkoli specializovaných buněk, v jiných případech pouze diferenciaci do buněk mimo mezodermové struktury (*Phinney DG, 2007*).

Jak již bylo výše uvedeno, první údaje, které nás přivedly k seriózním úvahám o možné transdiferenciaci kmenových buněk *in vivo*, pochází z údajů o transplantaci kostní dřeně, a to jak pokud jde o experimentální modely, tak i o

zkušenost s transplantací kostní dřeně u lidí. Nutným předpokladem pro transdiferenční studie pak byla existence technik, které umožňují simultánně průkaz dárcovských buněk i expresi tkáňově specifických markerů. Takovými metodami jsou například značení dárcovských buněk zeleným fluorescenčním proteinem nebo průkaz Y chromozómu při podání mužských buněk ženským pacientkám. Průkaz transdiferenciace se pak provádí většinou imunohistochemicky (**Theise ND, 2000; Izuta Y, 2005**).

V roce 1999 transplantoval Gussoni hematopoietické krvetvorné buňky zdravých krysích samců do samic mxd myši, což je model Duchennovy muskulární dystrofie. Dárcovské buňky se zabudovaly do svalů a exprimovaly dystrofin (**Gussoni E, 2009**). Podobné studie ukázaly, že HSC mohou přispívat k obnově kapilár a kardiomyocytů u myšího modelu infarktu myokardu (**Jackson KA, 2001**) nebo zachránit myši před jatrním selháním v modelu indukované tyrozinémie I (**Lagasse E, 2000**). U lidských příjemců transplantované kostní dřeně bylo zlepšení v případě osteogenesis imperfecta přičítáno přítomnosti MSC v transplantátu (**Horwitz EM, 1999**), ovšem vzhledem k tomu, že těchto buněk je v běžném dřevném štěpu minimální množství, nelze formálně vyloučit ani jiný mechanismus, totiž transdiferenciaci HSC. Stejně tak není jasný podíl HSC a MSC na transdiferenciaci do endotelií a hepatocytů v jiné práci (**Korbling M, 2002**).

Při podání *in vitro* kultivovaných MSC byl tedy prokázán omezený homing a o původu buněk nemůže být pochyb, úroveň homingu ovšem rozhodně nepostačuje k obnově tkání prostřednictvím transdiferenciace. K tomu je nutná výrazná proliferace darovaných MSC, což je záležitost navýsost problematická. Studií zkoumajících *in vivo* proliferaci transplantovaných MSC je totiž málo a jsou poměrně málo informativní (**Quiao H et al, 2016**). V případě studie tří šimpanzů, transplantovaných autologními či alogenními MSC s předchozím ozářením či bez něj, a usmrčeným po 9-21 měsících, činilo procento transplantovaných buněk značených zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) v jednotlivých orgánech od 0.1-2.7%. Tato čísla po takto dlouhé době od transplantace značí, že v autologním či alogenním prostředí jsou *ex vivo* připravené MSC schopné i proliferace *in vitro* (**Devine SM, 2003**), avšak ani ona nejsou natolik vysoká, aby mohla v kombinaci s transdiferenciací přinést výraznější léčebný efekt. Lokální podání sice dosahuje vyšší retence MSC v poškozených místech (**Tran N, 2006**), nicméně i odsud transplantované buňky mizí - jednak migrací do jiných orgánů (**Wang W, 2010**) a v případě xenogenní transplantace jsou likvidovány imunitním dozorem, a to i v případě imunodeficientních zvířecích modelů (**Kopen GC, 1999; Wang Y, 2007**).

Přes uvedené problémy s biodistribucí, retencí v tkáních a (blíže neobjasněnou) proliferační schopností transplantovaných MSC, byly pozorovány bona fide *in vivo* transdiferenciace MSC do astrocytů (**Kopen GC, 1999**), kardiomyocytů (**Toma C, 2002; Shinmura D, 2011**), osteoblastů (**Hwang NS, 2013**), hepatocytů (**Yin L, 2015**), či inzulin produkujících buněk (**Fazili A, 2016**). Diferenční potenciál MSC je závislý na mikroprostředí jak *in vitro*, tak *in vivo*. Dokladem toho je různý diferenční potenciál MSC z různých tkání (**Hass R, 2011; Elahi KC, 2016**). Kmenové vlastnosti MSC zabezpečuje exprese



transkripčních faktorů Oct4, Sox2 a Nanog, která jsou zvýšené v hypoxických podmínkách, ev. v kombinaci s vlivem chitosanu (**Taguchi T, 2017**). Diferenciační programy pak zahrnují vliv mechanických podnětů (**Steward AJ, 2015**), pH (**Dai Z, 2015**), přímých kontaktů s jinými buněčnými typy (**Kaigler D, 2005**) i parakinní a autokrinní sekreci (**Mayer H, 2005; Sharma RI, 2012**). Tím se však již dostáváme k mechanismům působení MSC na jiné buňky, což bude náplň kapitoly 1.4.3.

Konečně je nutné zmínit ještě potenciál nežádoucí transdiferenciace MSC. I za předpokladu diferenciaci do požadovaného buněčného typu může jít pouze o transdiferenciaci částečnou, buňky nemusí dobře plnit svou funkci (**Bieback K, 2012**). MSC se mohou diferencovat i nežádoucím způsobem, jak bylo popsáno ve studii experimentální léčby infarktu myokardu, kde se lokálně aplikované MSC diferencovaly v kostní tkáň (**Breitbach M, 2007**). Rovněž není možno pominout riziko transformace MSC v buňky podporující růst hematopoetických i nádorů, i když toto se týká spíše endogenních MSC než buněk transplantovaných (**Medyouf H, 2014; Ridge SM, 2017**).

### 1.4.3. Buněčná fúze

Na začátku 21. století byl mechanismus fúze zajímavým konceptem pro působení hMSC v poškozených tkáních. Nejprve Teranda popsal fenomén *in vitro* buněčné fúze mezi hematopoitickými kmenovými buňkami a embryonálními buňkami (**Teranda N, 2002**), dále pak Alvarez-Dolado popsal fúzi dřevňových buněk s Purkyňovými neurony (**Alvarez-Dolado M, 2003**). Další výzkumy však ukázaly, že k buněčným fúzím dochází příliš vzácně (1:500 000 buněk) na to, aby mohly mít terapeutický potenciál (**French SW, 2002**). Buněčné fúze *in vivo* představují možný obranný mechanismus některých tkání před nepříznivými vlivy (**Kemp K, 2014**) a pomocí transferu mitochondrií mohou podpořit aerobní respiraci (**Spees JL, 2006**). Na druhou stranu zvyšují míru buněčné nestability a buněčné fúze nádorových buněk s jinými buněčnými typy mohou zvyšovat jejich metastatický potenciál (**Platt JL, 2016**).

### 1.4.4. Protizánětlivé, imunomodulační a stimulační působení MSC

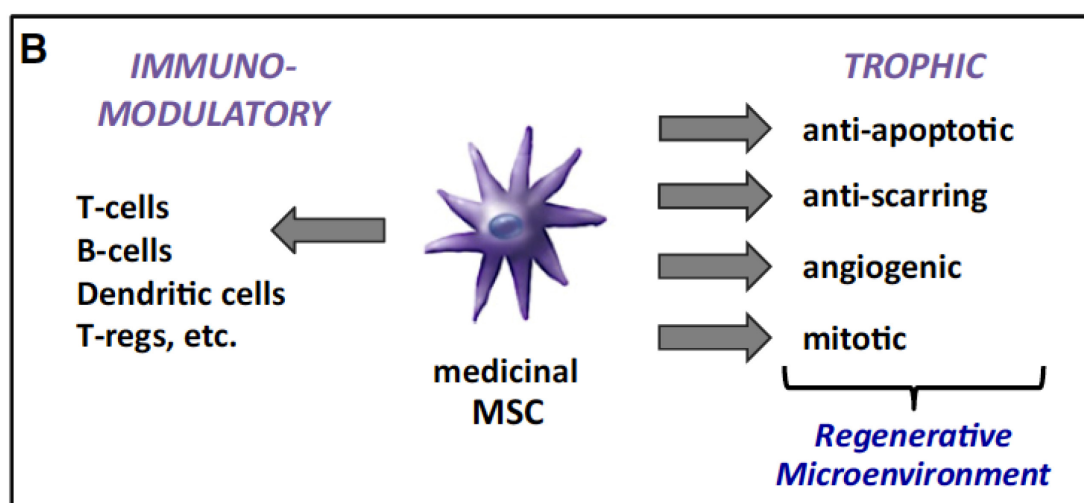
Jak již bylo uvedeno výše, je poněkud ošidné očekávat, že expandované, eventuálně prediferencované MSC se budou chovat v tkáních podle našich představ. Jejich retence v tkáních je problematická a jejich další *in vivo* proliferace nejistá. Řada výzkumníků se proto zaměřila na hledání fyziologických protějšků expandovaných MSC a na jejich funkci v organismu.

Seminární prací z tohoto hlediska byla práce Mihaely Crisan, která objevila v perivaskulárním tkáňovém kompartmentu buňky pozitivní na CD146, NG2, PDGFR beta a alfa-SMA (smooth-muscle actin). Buňky byly naopak negativní na endotelové markery, jako je CD31, CD34, CD144 nebo von Willebrandtův faktor (**Crisan M, 2008**). Po izolaci a expanzi tyto buňky nabyly v

kultuře markerů mezenchymových stromálních buněk, jako CD10, CD13, CD44, CD73, CD90 a CD105 a byly schopné diferenciaci do tří základních mezodermových linií podobně jako MSC izolované a expandované tradičním způsobem z celých tkání. Dříve a souběžně provedené práce pak zdokumentovaly, že tyto buňky jsou přítomny ve všech tkáních, přičemž čisté pericyty se vyskytují v mikrovaskulatuře, zatímco ve větších cévách buňky nabývají fenotypu hladkých svalových buněk, i když si zachovávají výše zmíněné pericytární markery CD146 a NG2 (*Hirschi KK, 1996, Traktuev DO, 2008*). Spekulace, podle které jsou pericyty prekursori všech MSC je tedy velmi lákavá, i když pericyty se od MSC částečně odlišují svým transkriptomem a diferenciacími schopnostmi (*Roobrouck VD, 2011; Pierantozzi E, 2015*).

Fyziologickou funkcí pericytů je podílet se na vaskulogenezi, udržovat cévní řečiště a podílet se na hojení tkáně. Již dlouho je známo, že v průběhu tvorby primitivního cévního řečiště přitahují endotelie primitivní mezenchymové buňky z invadovaných orgánů a směřují je k diferenciaci do pericytů a hladkých svalových buněk (*Risau W, 1998*). Pericyty pak inhibují další proliferaci endotelových buněk a podporují jejich diferenciaci pomocí TGF-beta (*Orlidge A, 1987*). Údržba cévního řečiště je spojena s ovlivňováním jeho tonu a tudíž průtoku kyslíku tkáněmi (*Kelley C, 1987*). Při poranění tkáně pak dochází k degradaci vaskulární bazální membrány a k uvolnění pericytů do okolí. Zde se mohou diferencovat do aktivovaných MSC, které produkcí VEGF a dalších angiogenních faktorů, jakož i pomocí přímých buněčných interakcí podporují proliferaci a migraci endotelových buněk (*Yancopoulos GD, 2000*). Tyto aktivované MSC též působí imunopresivně a antiapoptoticky, čímž zabráňují dalšímu poškození poraněné tkáně (*Caplan AI, 2011; Khubutiya MS, 2014*). Schéma působení aktivovaných ("medicinních") MSC je znázorněno na Obr. 5. Po ukončení svého působení jsou MSC zpět povolány do cévní stěny a transdiferencovány na pericyty pomocí PDGF-BB (*Caplan AI, 2011; Aguilera KY, 2014*). Tím dochází ke stabilizaci cévního řečiště.

Obr. 5 - *Caplan AI, 2011*. Imunomodulační a trofické působení aktivovaných MSC v poškozené tkáni.



Přijmeme-li výše uvedenou hypotézu o derivaci aktivovaných MSC z tkáňových pericytů, pak hlavním fyziologickým úkolem MSC je hojení ran a regenerace tkání, ovšem nikoli prostřednictvím výrazné proliferace a transdiferenciace, ale prostřednictvím secernovaných molekul a přímým kontaktem s jinými druhy buněk. Tento mechanismus působení by pak vysvětloval studie, v nichž bylo dosaženo terapeutického efektu MSC, aniž bylo pozorováno jejich připojení (*Iso Y, 2007; Prockop DJ, 2007*).

Soubor cytokinů, chemokinů a růstových faktorů produkovaných MSC se nazývá sekretom. Sekretomy MSC derivovaných z různých orgánů se mohou lišit (*Hsiao ST, 2012*) a mohou být ovlivněny kultivačními podmínkami (*Hsiao ST, 2013*). Řada molekul produkovaná MSC má několik mechanismů působení. **Angiopoeticky** působí VEGF-A, VEGF-D, HGF (hepatocytový růstový faktor), angiopoietin 1, bFGF, IGF-1, PDGF, PlGF (placentární růstový faktor), interleukin 6, MCP-1 (monocyty chemoatrahující protein) a erythropoetin (*Plotkin MD, 2006; Humpert PM, 2008; Shyu KG, 2008; Liu L, 2013; Yanagawa T, 2013; Chang HK, 2016*). **Antifibroticky** působí metaloproteázy MMP-2 a MMP-9, které rovněž usnadňují migraci MSC v poškozené tkáni, HGF, prostaglandin E2, bFGF a KGF (keratinocytový růstový faktor). MSC však secernují rovněž tkáňový inhibitor metaloproteáz TIMP-1, čímž mohou působit profibroticky. Profibrotické působení může mít i angiopoietin 1 (*Long DA, 2008; Xie JL, 2008; Kim CH, 2011; Sakamoto S, 2011; Alexaki VI, 2012; Ponte AL, 2012; Clarke MR, 2015; Dogh LH, 2015*). **Antiapoptotické působení** mají VEGF, HGF, IGF-1, bFGF, PDGF, GM-CSF (granulocyto-makrofágový růstový faktor) a interleukin 7 (*Prisco M, 1999; Skibinski G, 2001; Liu Z, 2014; Normanton M, 2014; Healy ME, 2015*). **Proliferační aktivity** stimulují VEGF, KGF, bFGF, IGF, PDGF a HGF (*Casey ML, 1997; Wang W, 1997; Warn R, 2001; Liu L, 2013; Huat TJ, 2014; Du M, 2017*). **Imunomodulační účinky** má indoleamin 2,3-dioxygenáza (IDO), TGF beta, prostaglandin E2, TSG6 (TNF-alfa stimulovaný gen/protein), STC1 (stanniokalcin), HGF, LIF (leukemický inhibiční faktor) a NO (*McCall-Culbreath KD, 2008; Ren G, 2008; Najar M, 2010; Bartosh TJ, 2013; Yoo SW, 2013; Hong J, 2016*). Překvapivě bylo zjištěno, že MSC mohou mít i antibakteriální působení prostřednictvím peptidu LL-37 (*Krasnodembskaya A, 2010*).

Růstové faktory jsou mezenchymovými buňkami secernovány v několika typech sekrečních tělísek. **Exozomy** jsou partikule cca 40-100 nm v průměru, která jsou secernovány v rámci tzv. multivezikulárních tělísek (*Denzer K, 2000*). Jejich membránu tvoří lipidová dvojvrstva podobně jako u lipozómu. Jsou secernovány aktivně, exocytózou regulovanou proteinem p53 (*Yu X, 2006*). Jsou bohaté na annexiny, tetraspaniny (CD63, CD81, CD9) a termální šokové proteiny (Hsp60, Hsp70 a Hsp90 - *Konala VB, 2016*). Po uvolnění do extracelulárního kompartmentu mohou interagovat s jinými buňkami skrze adhezi na buněčný povrch umožněnou povrchovými receptory, mohou být internalizovány endocytózou nebo mohou přímo splynout s buněčnou membránou cílové buňky (*Bang C, 2012*). Exozomy mohou kromě cytokinů a růstových faktorů sloužit rovněž k přenosu RNA, a vzhledem k tomu, že jejich membrány obsahují MHC antigeny, mohou sloužit i v antigen prezentaci (*Valadi H, 2007; Chaput N, 2011*). Vzhledem k expresi povrchových membránových proteinů mohou exozomy nahrazovat přímý buněčný kontakt (cell-cell interakci). Dalšími

sekrečními tělísky jsou větší **mikrovezikuly** (dříve ektozomy, 100-1000 um v průměru), které se od exozómů liší složením povrchové membrány a mohou tedy zprostředkovávat odlišné funkce (**Camusi G, 2010**). I ony se mohou podílet na transferu RNA či antigenní prezentaci.

Exozomy a mikrovezikuly umožňují teoreticky velmi lákavou představu "buněčné terapie bez buněk", tedy pouze s proteiny uzavřenými či vmezeřenými v dvouvrstvé lipidové membráně. Ve srovnání s klasickou buněčnou terapií jsou méně imunogenní, protože mají nižší obsah MHC antigenů (**Yeo RW, 2013**) a mohou být jednoduše skladovány při -20°C až po dobu šesti měsíců (**Webber J, 2013**). Ve srovnání s přímo dopravovanými malými molekulami pak odpadá problém rychlé degradace (**Valadi H, 2007**). Jestliže je hlavním mechanismem působení MSC jejich sekretom, pak buněčná terapie prostřednictvím MSC možná představuje pouze dočasnou alternativu před zavedením účinnější a bezpečnější léčby založené na exozomech. Na druhou stranu nelze pominout i nebezpečí: exozomy, stejně jako MSC, mohou nepřímým mechanismem podporovat růst nádorů (**Salido-Guadarrama I, 2014**) a kromě toho jsou exozomy spojovány s četnými neurodegenerativními onemocněními, přičemž není jasné, jsou-li jejich příčinou či následkem (**Bellingham SA, 2012**).

#### 1.4.5. Podpora krve tvorby

Podpora krve tvorby je úzce vázána na pojem "stem cell niche," tedy místa pro homing, aktivaci a proliferaci krevetvorných kmenových buněk (**Calvi LM, 2015**). Niche je ovšem termín užívaný v popisu mikroprostředí i jiných kmenových buněk než hematopoetických (**Bellingham SA, 2012; Salgado AJ, 2015; Aoki R, 2016**). Svou niche mají i nádorové kmenové buňky a to jak u hematologických tak u solidních tumorů (**Iwasaki H, 2009; Saki N, 2011**). Hematopoetické kmenové buňky a jejich niche byly ovšem studovány nejdříve, což souvisí se snadným získáváním materiálu a poměrně jednoduchou kultivací, jak uvedeno v kapitole **1.1**.

Většina hematopoetických kmenových buněk (HSC) je lokalizována ve vysoce vaskularizovaném endosteálním regionu kostní dřevě (**Kiel MJ, 2005**), i když některé jsou lokalizované i centrálně. Endosteální region obsahuje komplexní síť stromálních buněk, jako jsou buňky osteoblastové, endoteliální, dále pericyty, CXCL12 abundanční retikulární buňky (CAR), sympatické nervy a nemyelinizující Schwannovy buňky. Současný stav poznání ukazuje na existenci dvou druhů niche - arteriolárně pericytární a sinusoidně megakaryocytovou, přičemž obě jsou lokalizované v endostální oblasti.

V endostálním regionu hrají hlavní roli endotelové buňky a pericyty. Oba typy buněk exprimují stem cell faktor (SCF) a CXCL12, endotelové buňky pak navíc E selektin. Tyto molekuly jsou potřebné jak k chemoatrakci a retenci, tak i k udržení klidového stavu HSC (**Winkler IG, 2012; Greenbaum A, 2013; Kinisaki Y, 2013**). Jak bylo uvedeno v kapitole **1.4.3.**, pericyty jsou známy jako prekuzory MSC, které jsou schopné diferenciaci v osteoblasty, jejichž úloha v hematopoetické niche byla rovněž prokázána (**Sacchetti B, 2007**). Regulační úlohu v niche mají nervové buňky, které regulují expresi CXCL12 buňkami

stromálními na cirkadiálním principu (**Mendez-Ferrer S, 2008**). Nemyelinizující Schwannovy buňky pak exprimují TGF beta, který je rovněž nutný pro udržení HSC v klidové fázi (**Yamazaki S, 2011**). TGF beta je ovšem exprimován i buňkami mezenchymovými (**Orlidge A, 1987; Yoo SW, 2013**).

Zhruba 20% HSC u myši je lokalizováno v přímém kontaktu s megakaryocyty. Megakaryocyty jsou naopak lokalizovány perisinusoidálně, protože do sinusoid jsou uvolňovány krevní destičky. Megakaryocyty se rovněž podílejí na udržení HSC v klidové fázi, a to produkcí CXCL4 a TGF beta (**Bruns I, 2014; Zhao M, 2014**). Sinusoidně-megakaryocytová niche rovněž obsahuje pericyty, které mají vlastnosti dříve definovaných mezenchymových stromálních populací, jako jsou CAR buňky, stromální buňky pozitivní na leptinový receptor a stromální buňky pozitivní na GFP1 a nestin (**Mendez-Ferrer S, 2010; Omatsu Y, 2010, Zhou BO, 2014**). MSC pozitivní na leptinový receptor pak opět diferencují do osteoblastů (**Zhou BO, 2014**).

Poznatky o úloze MSC v konstituci hematopoetické niche vedou v současné době ke snahám o konstrukci této funkční jednotky *in vitro*. Význam těchto experimentů je značný, protože hematopoetická niche bývá poškozena v důsledku chemoterapie (**Li S, 2015**), radioterapie (**Dominici M, 2009**) či nemoci štěpu proti hostiteli po alogenní transplantaci (**Yao Y, 2014**). Tyto konstrukty mohou rovněž vést lepšímu pochopení nádorové niche, kde je fenotyp stromálních buněk ovlivňován buňkami nádorovými a na oplátku stromální buňky poskytují nádorovým buňkám ochranu před chemoterapií a radioterapií (**Meydounf H, 2014, Melzer C, 2017**).

Ačkoli dřívější studie zaměřené na expanzi hematopoetických kmenových buněk prokázaly, že jistého úspěchu lze dosáhnout cytokinovým kokteilem (**Zandstra PW, 1997**), v pozdějších pracech bylo zjištěno, že k expanzi spojené s udržením kmenového potenciálu hematopoetických buněk jsou potřebné i přímé buněčné kontakty. V těch hrají významnou roli beta1 integriny (**Gottschling S, 2007**). Další studie pak ukázaly, že HSC kultivované na MSC mají nejen lepší *ex vivo* expanzi, ale i lepší přihojení *in vivo* (**Huang GP, 2007**). Jing v roce 2010 prokázal, že v průběhu kultivace krvetvorných buněk s MSC se vytvářejí tři hematopoetické populace: buňky v supernatantu představují více či méně zralé elementy, buňky na MSC pak méně zralé progenitory a buňky migrující pod MSC jsou primitivní CD34+CD38- prekurzory. Migraci hematopoetických buněk pod vrstvu MSC bylo možno snížit blokádou CXCR4 a beta1 integrinů (**Jing D, 2010**).

Další pokrok ve výzkumu hematopoetické niche znamenal zavedení 3D kultur, které umožňují přesněji napodobit poměry v kostní dřeni. Trojrozměrné kultury umožňují simulovat akumulaci nebo depleci růstových faktorů a vytvoření hypoxického gradientu (**Sharma MB, 2012; Vaidya K, 2015**). Nejjednodušší kultury jsou hydrogelové, které však mají tu nevýhodu, že jejich velikost je limitována difusní kapacitou takto vytvořené organely (**Sharma MB, 2012**). Tvorba spontánních agregátů umožňuje kokultivaci více typů buněk, ale má podobná omezení (**Lancaster MA, 2013**).

Perspektivním směrem v tomto snažení má tvorba orgánů na čipu. Jde o

mikrofluidní komůrky, které jsou postupně osazovány jednotlivými typy buněk a kontinuálně perfundovány (**Torisawa YS, 2014**). Zatím byl v tomto modelu zkoumán vliv G-CSF a BPI (baktericidní/permeabilitu zvyšující protein) na produkci krevních buněk po ozáření s očekávaným výsledkem (**Torisawa YS, 2016**). Tento model je možno osadit více druhy buněk včetně endotelií s pokusem o napodobení vaskulatury a zkoumat na něm různé aspekty buněčné fyziologie a patologie, jako je význam jednotlivých cytokinů nebo odezva na léky. Potenciálně mohou orgány na čipu sloužit i jako nástroj diferenciací embryonálních kmenových či indukovaných pluripotentních buněk do jednotlivých specializovaných linií (**Sugimura R, 2016**). Konečně, orgány na čipu mohou být atraktivní metodou tkáňového inženýrství. Tímto se ovšem dostáváme od podpory krvetvorby mezenchymovými buňkami do oblasti regenerační medicíny, které se bude věnovat následující oddíl.

## 1.5. MSC a regenerativní medicína

### 1.5.1. - Terapeutické přípravky mononukleárních buněk z kostní dřeně (BMMC) bez manipulace *in vitro*

Mononukleární buňky z kostní dřeně (BMMC) tvoří přípravek snadno dostupný a léta užívaný k autologním i alogenním transplantacím kostní dřeně. Dnes je v této indikaci používán jen minimálně, protože hlavním zdrojem hematopoetických kmenových buněk k transplantacím představuje periferní krev (tzv. PBPC - peripheral blood progenitor cells). Vzhledem k dlouholetému používání ke dřevným transplantacím jsou však sběr a zpracování BMMC dobře standardizované a z regulačního hlediska brané jako produkty, které neprošly významnou manipulací (viz **kapitola 1.5.3.**). To znamená méně regulačních omezení a byl to důvod pro jejich používání v průkopnických studiích regenerativní medicíny. Nevýhodou BMMC je pak jejich špatná charakterizace a variabilita - jinými slovy, tyto preparáty představují směs buněčných progenitorů a zralých buněk, která se výrazně liší od dárce k dárci. Na druhou stranu se ukázalo, že i malé zastoupení jednotlivých buněčných typů - např. hMSC - může stačit k terapeutickému efektu.

Koncept využití BMMC v regenerativní medicíně se odvíjel od *in vitro* studií a experimentálních *in vivo* studií na zvířatech, které byly provedeny na přelomu století a byly pochopitelně limitovány tehdejšími technickými možnostmi. Vycházel z koncepce tří základních typů prekurzorů (hematopoetických, vaskulárních, mezenchymových), které mohou, ale nemusí pocházet z téže dospělé kmenové buňky (**Prockop DJ, 1997; Choi K, 1998; Dominici M, 2004**), přičemž vaskulární a hematopoetické buňky jsou si navzájem bližší než kterákoli z nich s buňkami mezenchymovými. Dále bylo prokázáno, že hematopoetické (CD34+), vaskulární (CD34+CD133+VEGFR2+) i osteogenní progenitory cirkulují ve zvýšených množstvích v krvi pacientů po akutním infarktu myokardu, ischemické cévní mozkové příhodě či po zlomenině (**Khosla S, 2006; Machalinski B, 2006; Turan RG, 2007; Lee DY, 2008**). Počet osteogenních progenitorů v periferní krvi je dále zvýšen i v pubertě (**Eghbali-**

**Fatourechí GZ, 2005).** Tyto poznatky podložily základ pro použití BMMC nebo i PBPC pro terapii svalových ischemií či nehojících se fraktur.

Doklad o účinnosti transplantace kostní dřeně u nehematologických indikací poskytl rovněž na přelomu tisíciletí Horwitz (**Horwitz EM, 1999; Horwitz EM, 2001; Horwitz EM, 2002**). Ve svých pracích aplikoval několika dětským pacientům s osteogenesis imperfecta, choroby charakterizované poruchou tvorby kolagenu typu I, který je nutný pro mineralizaci skeletu, krvetvorné buňky od zdravých dárců. Po transplantaci bylo zhruba 1-2% osteoblastů dárcovského původu, což však vedlo k lepšímu než očekávanému léčebnému efektu: došlo k výraznému nárůstu mineralizované hmoty, urychlení růstu takto transplantovaných dětí i ke snížení počtu patologických fraktur. V jiných indikacích ovšem byly používány autologní buňky, protože alogenní transplantace kostní dřeně je komplexní a život ohrožující zákrok (viz **kapitola 1.5.2.**) a v případě, že nejde o způsob genové terapie, tak nemá klinické opodstatnění.

Schopnost autologní kostní dřeně napomáhat hojení kosti byla prokázána již před téměř 150 lety Goujonem na králičím modelu (**Goujon E, 1886**). Ve druhé polovině minulého století byl tento poznatek využit při transplantacích různých typů kostních štěpů, které byly míseny s dřeňovou krví (**Salama R, 1978; Lindholm TS, 1980; Burwell RG, 1985**). Burwell v roce 1985 prokázal, že primitivní osteoprogenitory z kostní dřeně jsou zodpovědné za většinu biologické efektivity kostních štěpů (**Burwell RG, 1985**), což bylo v souladu s experimentálními pracemi Friedensteinovými (**Friedenstein AJ, 1968**). Po získání zkušeností na experimentálních zvířatech (**Paley D, 1986**) byly autologní injekce kostní dřeně úspěšně užívány v léčbě nehojících se fraktur (**Connolly JF, 1991, Garg NK, 1993**) či osteonekróz (**Hernigou P, 2002**). Byla prokázána přímá úměra mezi počtem aplikovaných osteogenních progenitorů a úspěšností procedury (**Hernigou P, 2005**). Ortopedická léčba pomocí BMMC se ukázala jako bezpečná, i když je nutno brát do úvahy riziko tukové embolizace (**Orlowski J, 1989**). Konečně, randomizovaná klinická studie (**Lee DH, 2014**) ukázala, že při léčbě kostních defektů distrakční osteogeneze podání BMMC spolu s plazmou bohatou na destičky (PRP) urychluje a zlepšuje hojení. Tyto studie položily teoretický základ pro využití expandovaných hMSC v ortopedických aplikacích (viz **kapitola 1.5.5.**).

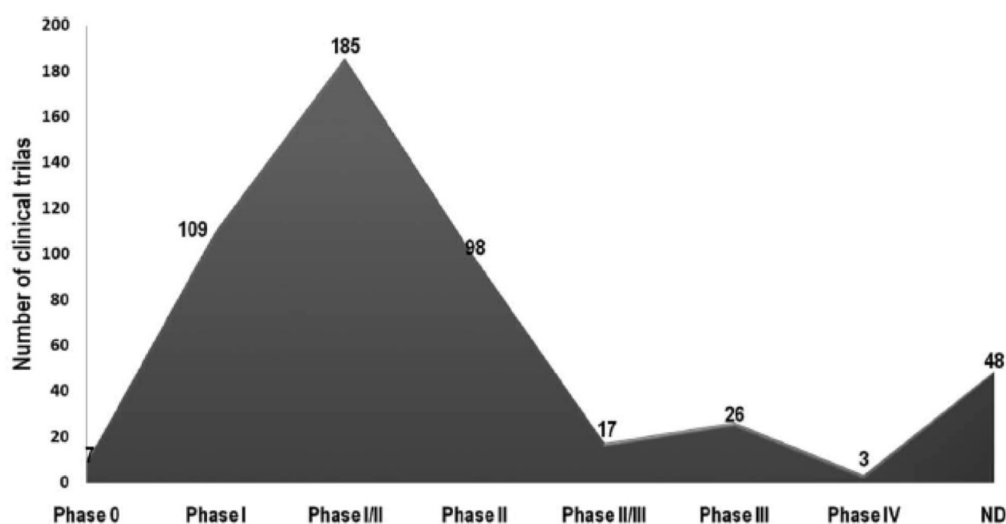
Užití BMMC z kostní dřeně v léčbě ischemií srdečního svalu či končetinových ischemií bylo rovněž nejprve zkoušeno experimentálně. Publikovány byly práce, které uváděly schopnost transdiferenciace lidských či zvířecích vaskulárních či mezenchymových buněk do funkčních kardiomyocytů (**Badorff C, 2003; Yeh TH, 2003; Kawada H, 2004**), načež následovaly práce na zvířecích modelech, které prokázaly schopnost mobilizovaných dřeňových buněk hojit infarkt myokardu (**Orlic D, 2001**) či zachránit ischemickou končetinu (**Kalka C, 2000; Li S, 2006**). Tyto výsledky vedly k celé řadě klinických studií fáze II, které byly, jak jinak, velmi slibné (**Assmus B, 2002; Strauer B, 2002; Tateishi-Yuyama E, 2002, Huang P, 2005**). Kromě akutního infarktu myokardu a ischemické choroby dolních končetin byla zkoušena i schopnost BMMC zlepšit srdeční funkci u chronické ischemické choroby srdeční (**Gao RL,**

2006) či městnavého srdečního selhání (*Kueth F, 2005*). BMSC byly aplikovány buď intraarteriálně v průběhu katetrizace srdeční pro akutní infarkt myokardu, intrakardiálně u chronické ischemické choroby srdeční či srdečního selhání nebo intramuskulárně do musculus gastrocnemius u ischemické choroby dolních končetin.

### 1.5.2. Úskalí přenosu terapeutického potenciálu hMSC do klinické praxe

První klinickou aplikaci hMSC publikoval v roce 1995 Lazarus (*Lazarus HM, 1995*). Jak bude uvedeno dále, tato práce se zaměřila výhradně na bezpečnost produktu a prokázala, že hMSC je možno bezpečně podat nitrožilně v dávce až  $50 \times 10^6$ . Další vývoj, zejména průkaz účinnosti MSC *in vivo* na řadě zvířecích modelů, podnítil celou řadu klinických studií. K 7.3.2017 jich bylo na serveru [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) registrováno 798 (hledáno podle mesenchymal AND (cell OR cells), z čehož 198 bylo ukončeno (méně než 10 s uvedenými výsledky) a 213 v současné době nabírá pacienty. Dle nedávného podrobného přehledu (*Squillaro T, 2016*) bylo k 15. červnu 2015 registrováno 493 ukončených či běžících studií. Většina těchto studií byla fáze I, resp. I-II, tj. se zaměřením na bezpečnost a získání prvních dat o účinnosti. Postmarketingové studie fáze IV byly jen tři (**Obr. 6**). Rozdělení klinických studií dle indikací k léčbě je uvedeno na **Obr. 7**.

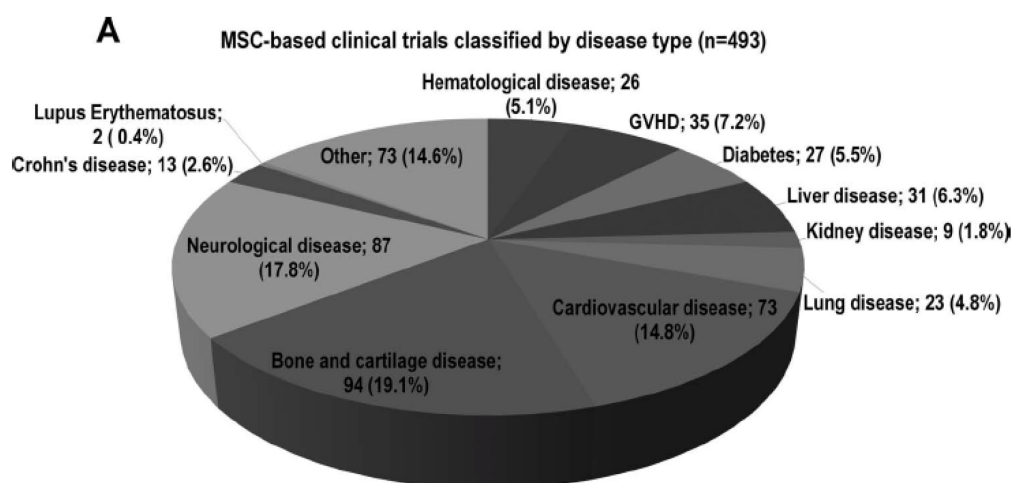
**Obr. 6 – Squillarto T, 2016. Počet klinických studií registrovaných na [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) k 15. 6. 2015 podle typu studie.**



Výsledkem dosud provedených klinických studií je, že máme poměrně dost dat ohledně bezpečnosti hMSC (viz níže **kapitola 1.5.5.**), ovšem ohledně jejich účinnosti je dat málo a jsou nekonzistentní. Jak je tomu ve všech lékařských odvětvích, nadějně výsledky studií fáze II (doklady účinnosti) jsou často studiemi fáze III (randomizované studie účinné látky s placebem či standardní terapií) vyvráceny či minimálně zpochybněny.



Obr. 7 – Squillarto T, 2016. Rozdělení klinických studií registrovaných na [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) podle léčebných indikací.



Problémy v přenosu preklinických dat do praxe jsou dvojí: buď jsou klinické studie koncipovány na základě insuficientních vědeckých poznatků - sem patří všechny studie nemanipulovaných hMSC, nebo naopak solidní vědecké výsledky není možno v klinice uplatnit, většinou v důsledku problémů s bezpečností produktu. Sem patří především geneticky modifikované produkty. Geneticky modifikovaných buněk, stejně jako komplexnějších buněčných přípravků (více typů buněk, buňky na tkáňových scaffoldech) se do značné míry týká následující **kapitola 1.5.3.** a nebudeme se jimi tudíž v následujících odstavcích zabývat.

Co se týče koncepcí klinických studií bez náležité vědecké opory, sem patří především studie počáteční, zaměřené na miskoncepci transdiferenciace a proliferace *in vivo*. Přitom do těchto produktů byly celosvětově investovány značné peníze, z čehož pochopitelně plyne neochota investorů opustit dlouhodobě financovaný projekt a místo toho se podílet na vývoji produktu jiného. Naopak je patrný tlak investorů na schválení buněčného produktu i v případě, že randomizované studie fáze III dosáhnou negativních výsledků. Uvedené problémy si můžeme velmi dobře demonstrovat na peripetiích přípravku remescell-L (obchodním názvem Prochymal ©, Osiris Therapeutics, Inc.) v léčbě refrakterní nemoci štěpu proti hostiteli (GvHD).

Nemoc štěpu proti hostiteli (GvHD) je imunologická reakce k níž dochází po alogenní transplantaci krvetvorných buněk (vzácně i v jiných klinických situacích) a při které dochází k poškozování orgánů příjemce imunitními buňkami dárce. Akutní GvHD (zhruba do dne +100 po transplantaci) se rozvine i přes preventivní podávání imunosupresív zhruba u 40-60% pacientů po alogenní transplantaci a podílí se zhruba na 15% úmrtí v důsledku této procedury (**Sung AD, 2013**). Akutní GvHD poškozuje především kůži (vyrážka až

exfoliativní dermatitida), játra (může vést až k jaternímu selhání) a gastrointestinální systém (průjmy, v krajním případě perforace). Chronická GvHD vyžadující léčbu se rozvine zhruba u 30-40% pacientů v prvních dvou letech od transplantace a může postihnout jakýkoli orgán (**Flowers MED, 2015**). Léčbou první linie jsou u obou forem steroidy, pacienti, kteří na léčbu steroidy nezareagují, mají velmi špatnou prognózu a neexistuje pro ně standardní léčba.

Lidské MSC jsou vzhledem ke svým imunomodulačním a imunosupresivním vlastnostem velmi lákavým způsobem léčby GvHD. První případ úspěšné léčby těžké steroid-rezistentní akutní GvHD byl publikován v roce 2004 (**Le Blanc K, 2004**), v roce byla publikována fáze II studie v této indikaci pod patronací Evropské skupiny pro transplantaci kostní dřeně (EBMT). V uvedené studii bylo léčeno 55 pacientů, odpovědi bylo dosaženo u 30 z nich (54%). Pacienti, u nichž bylo celkové odpovědi dosaženo, měli lepší celkové přežití ve dvou letech než pacienti bez odpovědi (54% v. 16%,  $p = 0.018$ ). Použité buňky byly jak od HLA-identických sourozenců tak od haploidentických nebo zcela nepříbuzných dárců (**Le Blanc K, 2008**).

Prochymal© (též remestemcel-L, Osiris Therapeutics Inc.) je preparát připravený z hMSC od více dárců, vyrobený tradičním způsobem (s fetálním telecím sérem) a zamražený k použití v případě potřeby. V roce 2009 byly zveřejněny formou tiskové zprávy předběžné výsledky dvou velkých klinických studií fáze III zahrnující celkem 452 pacientů, léčených přípravkem Prochymal©. V první studii byli zahrnuti pacienti s akutní, steroid refrakterní nemocí štěpu proti hostiteli. Pacienti buď dostávali dostupnou farmakologickou léčbu s přípravkem Prochymal© nebo samotnou farmakologickou léčbu. Kompletní odpověď v délce trvání alespoň 28 dní mělo 35% pacientů léčených hMSC v. 30% pacientů, kteří hMSC nedostali ( $p = 0.3$ ). Ve druhé studii dostávali pacienti s nově diagnostikovanou akutní GvHD buď přípravek Prochymal© spolu se steroidy nebo steroidy samotné. Hodnoceni byli pacienti, kteří přežili alespoň 90 dní od zahrnutí do studie. Kompletní odpovědi dosáhlo 45% pacientů dostávajících kombinovanou léčbu v. 46% pacientů, kteří dostávali pouze steroidy. Textovou zprávu je velmi obtížné dohledat, ze serveru společnosti Osiris byla stažena, odkaz je např. na stránkách <https://www.firstwordpharma.com/node/375853?tsid=17> nebo <https://www.thestreet.com/story/10595563/1/osiris-drugs-failure-was-easy-to-envision.html>. Částečně byly zveřejněny pouze výsledky první studie (**Martin PJ, 2010**).

V roce 2013 byla publikována práce, která analyzovala příčiny selhání léčby přípravkem Prochymal© u steroid-refrakterní akutní GvHD s přihlédnutím ke slibným výsledkům evropských studií fáze II (**Galipeau J, 2013**). Zatímco v evropských studiích byly podávány hMSC od jednoho dárce, pasážované na maximálně pět léčebných dávek, Prochymal© obsahuje hMSC od více dárců expandovaných tak, že od každého dárce je získáno až 10 000 léčebných dávek (jedna dávka,  $2 \times 10^6$  hMSC/kg). Je přitom známo, že s počtem pasáží klesá schopnost MSC ovlivňovat GvHD *in vivo* (**von Bahr L, 2012**), což zřejmě souvisí s jejich sníženou schopností upregulovat tvorbu indoleamin 2,3-dioxygenázy (IDO) po stimulaci gamma interferonem. Tato kapacita je totiž zodpovědná za

imunosupresivní schopnosti hMSC (**Francois M, 2012**). U MSC expandovaných až na samou mez jejich replikační kapacity naproti tomu dochází ke zvýraznění jejich prozánětlivých vlastností oproti vlastnostem imunopresivním (**Rodier F, 2009**). Dále, zatímco v evropských studiích fáze II byly hMSC podávány okamžitě po kultivaci, Prochymal© obsahuje buňky kryoprezervované, přičemž bylo pozorováno, že schopnost hMSC produkovat indoleamin 2, 3-dioxygenázu (IDO) je snížena u kryoprezervovaných buněk (**Francois M, 2012**). Nelze vyloučit ani zvýšenou imunogenicitu preparátu Prochymal© (od více dárců) ve srovnání s hMSC od jednoho dárce, zejména v kombinaci s jejich opakovaným podáním (**Xu HL, 2012**).

S tímto racionálním rozbohem problému kontrastuje přístup firmy Osiris a bohužel i některých regulačních agentur. Jak již bylo řečeno, tisková zpráva o negativních výsledcích obou uvedených studií byla stažena z firemních webových stránek. Dosud, tj. po téměř osmi letech, nebyla ani jedna ze studií publikována *in extenso*. Prezentace studie zabývající se léčbou steroid-refrakterní akutní GvHD na Tandemovém mítinku Americké společnosti pro krevní a dřeňovou transplantaci (**Martin PJ, 2010**) byla spíše než na vysvětlení negativních výsledků zaměřena na neplánovanou analýzu léčených subpopulací, ve snaze "vykutat" alespoň nějaké pozitivní výsledky. Takovéto analýzy jsou přitom zatíženy vysokou nespolehlivostí a měly by být - pokud vůbec - používány jen na velkých souborech pacientů. Firmě Osiris se nakonec podařilo prosadit registraci přípravku Prochymal© pro léčbu steroid-refrakterní akutní GvHD u dětí, a to v Kanadě a na Novém Zélandě, na základě jediné nerandomizované studie fáze II (**Kurtzberg J, 2014**). Cena léčby se má pohybovat okolo \$ 200 000.

Uvedený příklad ukazuje, jak je ošidné spoléhat na nerandomizované klinické studie, ale i jak problematické je nasazovat buněčné preparáty do klinických studií bez přesného pochopení mechanismu jejich účinku. Rutinně stanovovanými znaky totiž naprosto nejde imunopresivní schopnosti konkrétního hMSC preparátu vůbec odhadnout a teprve v současné době jsou ustanovována kritéria pro jejich stanovení (**Galipeau J, 2016**). Jak z výše uvedeného příkladu vyplývá, stoprocentní spolehnutí na objektivitu a vědeckou erudici regulačních agentur rovněž není možné.

### 1.5.3. Léčebné produkty pro pokročilou terapii (advanced therapy medicinal products)

Lidské mezenchymové stromální buňky jsou řazeny mezi pokročilé léčebné produkty (advanced therapy medicinal product, ATMPs), podle Evropské směrnice č. 1394/2007, spolu s dalšími somatickými buňkami pro léčebné užití. Podle tohoto dokumentu, pokročilé léčebné produkty odvozené od somatických buněk jsou ty, které splňují následující charakteristiky: **1.** skládají se či obsahují buňky, které byly podrobeny *významné manipulaci*, která změnila biologické charakteristiky, fyziologické funkce nebo morfologické vlastnosti relevantní pro zamýšlené klinické použití, nebo buňky, *kteřé jsou zamýšlené k použití pro jiné účely než jaké plní v dárcovském organismu* (kurzíva RP), a **2.**

mají vlastnosti, pro které jsou užívány u lidí či podávány lidem k léčbě, prevenci nebo diagnostice nemocí skrze své farmakologické, imunologické nebo metabolické účinky.

V současné době ve světě existuje významná snaha o zahrnutí ATMPs (včetně mezenchymových stromálních buněk) do současných farmakologických a farmaceutických směrnic. Toho je možno dosáhnout v zásadě dvojím způsobem – buď stanovením specifických směrnic pro tento sektor, nebo snahou o zahrnutí této problematiky do směrnic již existujících. Obojí je spojeno s řadou praktických problémů, protože na buněčné produkty nelze vztáhnout běžné požadavky týkající se bezpečnosti (prakticky neexistují letální dávky atd.) či sterility produktů (není možná sterilizace běžnými způsoby). Mezinárodní harmonizační konference (International Conference on Harmonization, ICH), která byla založena v roce 1990 s cílem uvést do souladu různé místní požadavky pro registraci léčiv, nedisponuje v současné době žádnými specifickými doporučeními týkajícími se buněčné terapie, ačkoli některé zásady se dají uplatnit (např. ICH S6, ICH Q5A-4). Dá se říci, že obecná shoda ohledně regulačních přístupů k buněčným léčebným produktům v současné době ve světě neexistuje.

V poslední době EU, USA a Kanada zavedly nové způsoby regulace ATMPs, které jsou orientované na riziko, které s sebou tyto produkty přinášejí a které podléhají příslušným místním zákonným směrnicím. Systém Evropské unie formuluje minimální požadavky na dokumentaci, která musí být získána a uchována, co se týče získávání, vstupního hodnocení, kultivace, konzervace, skladování a distribuce lidských buněk. To zahrnuje výběr dárců, dohledatelnost jednotlivých šarží produktů, hlášení nežádoucích účinků, systém kontroly kvality založený na správné klinické praxi, a ochranu důvěrnosti získaných informací. K tomuto účelu byla v Evropské unii zřízena Komise pro pokročilé terapie (Committee for advanced therapies, CAT), která funguje při Evropské agentuře pro léčiva (European Medicines Agency, EMA) pod směrnicí EC č. 1394/2007. Hlavní odpovědnost této komise spočívá v přípravě podkladů pro hodnocení každé žádosti o schválení ATMP přípravku před konečným verdiktem, který vynese Komise pro lékařské produkty pro použití u člověka (Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP). Tento verdikt je následně formálně schválen Evropskou komisí a je závazný pro všechny státy EU.

Regulační systémy tedy rozlišují mezi buněčnými produkty, které prošly *významnou manipulací*, na rozdíl od těch, které takovou manipulací neprošly. *In vitro* kultivace hMSC jednoznačně znamená významnou manipulaci s buňkami, které byly izolovány z lidského těla, protože prostřednictvím kultivace v nepřírodném prostředí byly tyto buňky přeměněny v artefakt, který se, striktně vzato, v organismu nevyskytuje. Významná manipulace rovněž zahrnuje separaci buněk, například jejich selekci monoklonálními protilátkami. Na druhé straně mezi významné manipulace nepatří prostá izolace mononukleárních buněk z kostní dřeně, periferní krve či tukové tkáně pomocí sedimentačních či centrifugačních metod. Takto získané buňky jsou navíc vesměs určeny k užití ve stejném kontextu, jaký vykonávají v těle, tj. k regeneraci poškozených či stárnoucích tkání. Dá se tedy argumentovat, že výše zmíněné regulace EU se na

takovéto produkty nevztahují, i když toto je stále předmětem debaty a v poslední době se čím dál tím více uplatňuje striktnější výklad této regulace a zákonů z nich odvozených. Příprava „nemanipulovaných“ buněčných produktů pro klinické užití rovněž vyžaduje postupy podle principů správné výrobní praxe, ale regulační požadavky v těchto případech se spíše podobají požadavkům pro krevní produkty, takže nemanipulované buňky mohou být připravovány ve vhodných transfusních zařízeních. Jde například o výše zmíněné BMMC, které je tedy z regulačního hlediska snazší léčebně uplatnit a řada studií, která s nimi byla provedena, přinesla povzbudivé výsledky (*Salama R, 1978; Connolly JF, 1991; Garg NK, 1993; Assmus B, 2002; Hernigou P, 2002; Strauer B, 2002; Tateishi-Yuyama E, 2002; Hernigou P, 2005; Huang P, 2005; Kuethe F, 2005; Gao LR, 2006; Ge J, 2006; Janssens S, 2006; Schachinger V 2006a; Schachinger V 2006b; Liu FP, 2012; Cheng K, 2013; Teraa M, 2013; de Jong R, 2014; Lee DH, 2014; Moazzami K, 2014; Peeters Weem SM, 2015; Wollert KC, 2015*). Rovněž existuje přímá výjimka z Evropské směrnice č. 1394/2007: Jsou to ATMP připravené v nemocnici na základě požadavku pro konkrétního pacienta a podle specifických místních požadavků na kvalitu, musí být užity ve stejném členském státě EU, v jakém jsou připraveny, a jejich použití závisí výhradně na zodpovědnosti indikujícího lékaře (*Pytlík R, 2011*).

#### 1.5.4. Zásady správné klinické praxe (GMP)

Existuje celá řada směrnic pro přípravu léčiv (klasických i pokročilých) podle principů správné výrobní praxe (good manufacturing practice, GMP). Tyto směrnice ovšem nepředstavují přesné instrukce, jak tyto produkty připravovat. Spíše se jedná o sérii principů, které musí být splněny během výrobního procesu. Cílem je získat konečný produkt vyrobený z definovaných materiálů definovaným, dokumentovaným a dohledatelným způsobem a připravený příslušně vyškoleným personálem (laboranty). Podobně jako regulační principy, ani GMP principy nejsou zatím plně adaptovány na často unikátní způsoby přípravy buněčných produktů. Nicméně hlavní GMP principy uplatnit lze. Patří sem především následující:

**Výchozí materiály.** Výchozí materiály musí být v dokumentované kvalitě. Musí být certifikované výrobcem a jejich šarže by měly být registrovány. To nutně neznamená, že všechny užití materiály musí být schváleny pro klinické užití, i když je to pochopitelně výhodnější. Když nejsou k dispozici materiály schválené pro klinické užití, je nutno získat dostatečnou dokumentaci o produkci a skladbě jednotlivých šarží, aby bylo možno vyloučit jejich kontaminaci nežádoucími příměsemi. Dokumentace ohledně užitých materiálů musí být skladována po dobu požadovanou zákonem.

**Výrobní proces.** Výrobní proces musí být jasně definován sadou instrukcí známých jako standardní operační postupy (SOP). Tyto musí být napsány jasným a nedvojznačným jazykem a musí být snadno dostupné pro personál.

**Dokumentace.** Každá část výrobního procesu musí být dokumentována,

počínaje skladovacími podmínkami pro výchozí materiály (teploty lednic a mrazáků), až k výslednému produktu. Tato dokumentace by měla být schopna dokázat, že standardní operační postupy byly skutečně dodržovány a že kvalita produktu odpovídá očekávání. Jakékoli odchylky od standardních operačních postupů musí být dokumentovány.

**Validace.** Národní legislativy většinou definují soubory doporučených postupů pro různé části výrobního postupu (např. požadované testy pro vyloučení bakteriální kontaminace, tak, jak jsou definovány v Lékopise). Tyto procedury jsou však většinou zamýšleny pro výrobu konvenčních léčiv a nemohou být vždy užity pro produkty buněčné terapie (např. sterilizace či mikrobiální testy konečného produktu.) Validace znamená srovnání alternativního postupu s postupem zákonně definovaným a doklady o tom, že tyto alternativní postupy přinášejí srovnatelné výsledky.

**Standardizace.** Systém vnitřních kontrol kvality je naprosto nezbytný. Co se týče externích způsobů kontroly kvality, existuje celá řada programů prováděných buď národními autoritami či komerčními subjekty. Výrobce musí kontrolovat skladovací prostory, aby zamezil ztrátě kvality, kontaminaci, zkřížené kontaminaci a chybnému propuštění či distribuci konečných produktů. Skladovací teploty musí být validovány pro každý druh produktu a je s výhodou užívat certifikované přístroje. Dále musí být definován soubor kritérií pro propuštění produktu, tyto standardy musí být dodržovány a propouštěcí kritéria pro každou šarži produktu musí být zdokumentována.

Požadavky pro buněčné produkty jsou v tomto smyslu uvedeny např. v Mezinárodních standardech pro sběr, přípravu a užití produktů buněčné terapie (International Standards for Cellular Therapy Product Collection, Processing and Administration, Fourth Edition, Version 4.1, April 2011) připravené FACT-JACIE. Tyto standardy mají poskytovat minimální směrnice pro programy, zařízení a osoby, které provádějí buněčnou transplantaci a terapii nebo které tyto procedury podporují.

**Dohledatelnost.** Je nutno archivovat všechny výrobní záznamy (včetně záznamů o distribuci), které umožňují sledovat osud každé individuální šarže léčebného produktu. Musí existovat systém, který umožní včas stáhnout jakoukoli šarži z distribuce. Pokud se vyskytnou nežádoucí účinky, je nutné vyšetřit, zda nedošlo k nesrovnalostem ve výrobním postupu a musí být podniknuty kroky, aby příslušná šarže byla stažena z oběhu a aby se předešlo opakování možných chyb. Musí být založena databáze nežádoucích účinků léků (farmakovigilance).

**Trénink.** Personál (laboranti) musí být plně seznámeni se standardními operačními postupy, plně v nich vycvičeni a jejich znalosti musí být podrobovány pravidelnému přezkoušení.

Požadavky správné výrobní praxe jsou regulovány národními a mezinárodními legislativy a dodržování těchto požadavků je kontrolováno speciálními úřady – v Evropě je to EMA (Evropská agentura pro léčiva, European

Medical Agency), ve Spojených státech FDA (Úřad pro potraviny a léky, Food and Drug Administration). Některé další země, jako Austrálie, Kanada, Japonsko, Singapur či Spojené království mají své vlastní požadavky pro správnou výrobní praxi. V ostatních zemích, zejména v rozvojovém světě, je užívána WHO verze požadavků správné výrobní praxe. Kontrola dodržování požadavků správné výrobní praxe je prováděna pomocí pravidelných inspekcí pověřených státních organizací (v ČR jde o SÚKL).

## Výrobní zařízení

Výrobní zařízení splňující požadavky správné výrobní praxe jsou základním předpokladem pro přípravu léčebných produktů. Jsou navrženy tak, aby splňovaly požadavky na správné výrobní prostředí, aby zamezily kontaminaci produktu vstupními materiály a zkříženou kontaminaci mezi šaržemi a aby zajistily, že standardní operační postupy budou dodržovány tak, jak mají být. Opět, GMP zařízení pro buněčnou terapii se mohou lišit od zařízení pro přípravu konvenčních léčiv.

Design čistých prostor musí odpovídat Mezinárodnímu standardu ISO 14644 – Čisté prostory a přilehlá kontrolovaná zařízení. ISO 14644 se skládá z osmi částí:

ISO 14644-1: Klasifikace čistoty vzduchu

ISO 14644-2: Specifikace způsobů testování a monitorace čistoty vzduchu v souladu s normou ISO 14644-1

ISO 14644-3: Testovací metody

ISO 14644-4: Design, konstrukce a zahájení provozu

ISO 14644-5: Vlastní provoz

ISO 14644-6: Slovníček

ISO 14644-7: Kontrolovaná zařízení (laminární boxy, boxy pro manipulaci v rukavicích, izolátory, mikroprostředí)

ISO 14644-8: Klasifikace vzduchem přenášené molekulární kontaminace

Zacházet do detailů je nad rámec této práce. Jako příklad je uvedena norma ISO 14644-1 (klasifikace čistoty ovzduší – **Tab. 2**) a schéma konceptu kontroly kontaminace podle normy ISO 14644-4 (**Obr. 8**).

Stoupající požadavky na čistotu vzduchu (od prostor třídy C až k výrobní buňce třídy A) jsou zajištěny speciálními systémy cirkulace vzduchu, které zajišťují nejvyšší tlak ve výrobní buňce, a tlakový gradient se dále snižuje směrem k periferním částem výrobního zařízení. Vzduch je do kontrolovaného prostředí vpouštěn přes vysoce efektivní či velmi vysoce efektivní částicové filtry (high-effective nebo ultrahigh-effective particle filters – HEPA nebo UEPA). Při vstupu opačným směrem (tj. z méně čistých do čistších prostor) je nutné projít přes filtry, které jsou zařízeny k dekontaminaci materiálu i personálu.

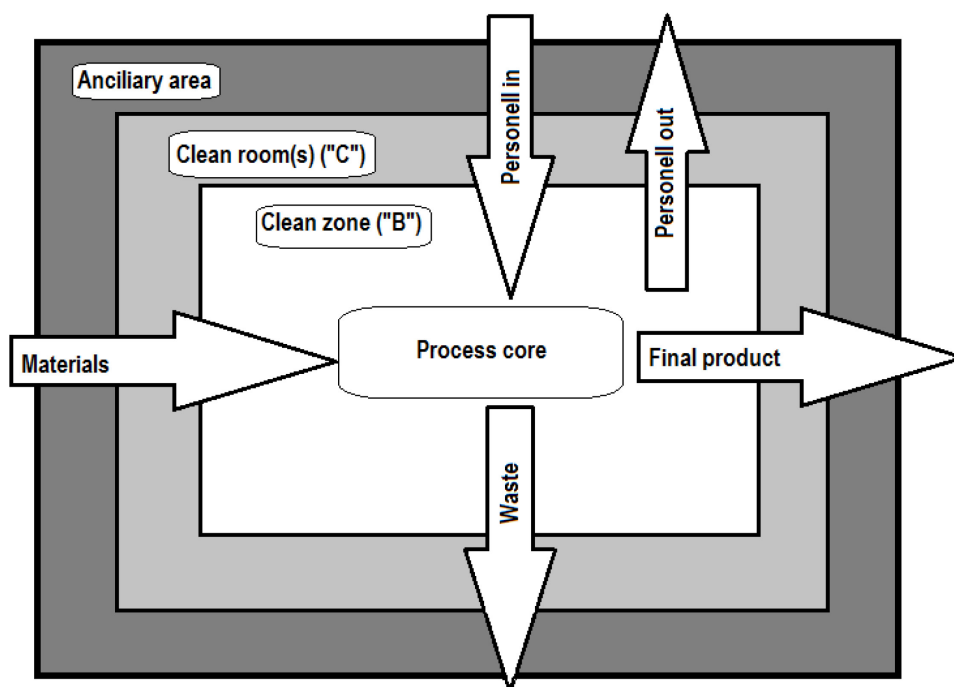
Z výše uvedeného je jasné, že konstrukce a provoz zařízení pro správnou výrobní praxi je velmi nákladné. Tyto náklady se pak přirozeně promítají do

Tab. 2 – Pytlík R, 2011. Klasifikace čistoty ovzduší.

ISO classification number	Maximum concentration limits (particles/m <sup>3</sup> of air) for particles equal to or larger than the considered sizes shown below					
	0,1 um	0,2 um	0,3 um	0,5 um	1um	5 um
ISO Class 1	10	2				
ISO Class 2	100	24	10	4		
ISO Class 3	1 000	237	102	35	8	
ISO Class 4	10 000	2 370	1 020	352	83	
ISO Class 5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	29
ISO Class 6	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293
ISO Class 7				352 000	83 200	2 930
ISO Class 8				3 520 000	832 000	29 300
ISO Class 9				35 200 000	8 320 000	293 000

konečné ceny produktu. Pro malá GMP zařízení – např. při univerzitách nebo pro Fáze 1 klinických studií – však existuje několik menších, levnějších a dostupnějších řešení (např. Tecan - [www.lifesciences.tecan.com](http://www.lifesciences.tecan.com), Xvivo Biosystems - [www.biospherix.com](http://www.biospherix.com) a další – Obr. 8-11).

Obr. 8 – Pytlík R, 2011. Schéma čistých prostor pro GMP. Klasifikace prostor odpovídá požadavkům pro čistotu vzduchu. Například, čistá prostora pro GMP třídy C vyžaduje čistotu vzduchu ISO třídy 8 nebo čistší.



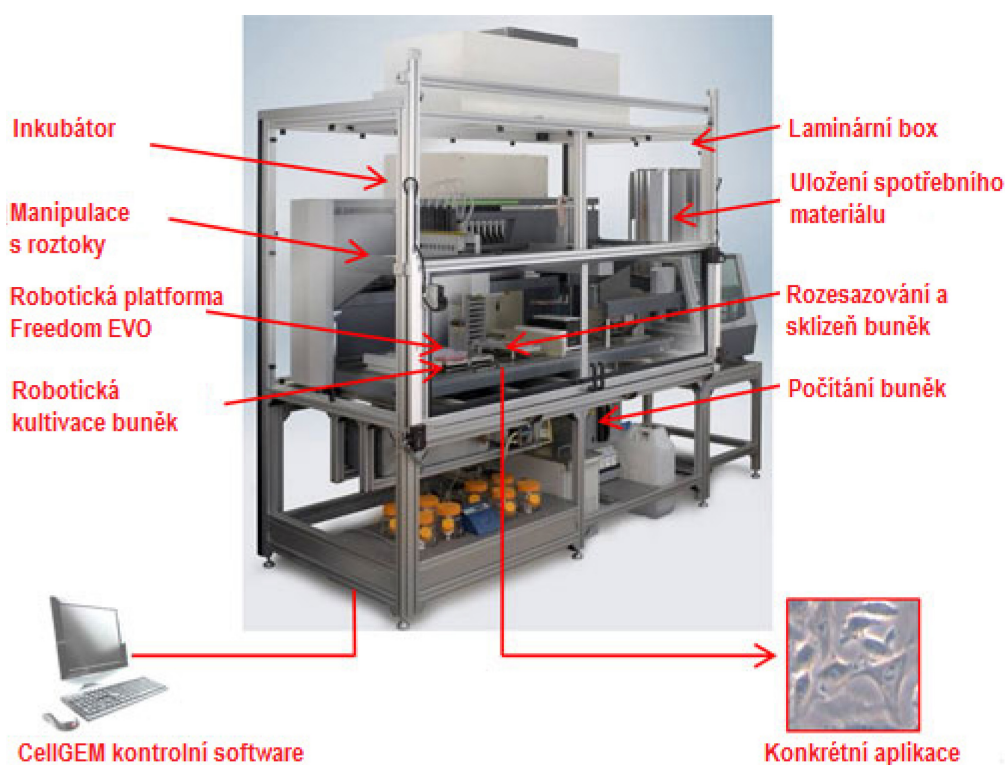
### 1.5.5. Uchování hMSC pro další použití

Jedinou možností pro dlouhodobí uskladnění MSC je jejich kryoprezervace v tekutém dusíku. Kryoprezervace má teoretickou výhodu v možnosti okamžitého podání hMSC ("off the shelf") bez nutnosti jejich



zdlouhavé, několikátýdenní kultivace "on demand" (*Yong KW, 2015b*). Při zmrazování buněk je nutno vyhnout se tvorbě vodních krystalů, jejichž tvorba buňky zabíjí. Existují dvě metody kryoprezervace - pomalé zamrazování a vitifikace. Při obou je potřeba užití kryoprotektivních agens (CPA). Nejčastěji používaným CPA je dimethylsulfoxid (DMSO), který však přestupuje přes buněčnou membránu a je cytotoxický, pokud se teplota pohybuje nad 4°C (*Zambelli A, 1998*). Navíc má schopnost minimálně v některých typech buněk působit epigenetické změny, s potenciálem nádorové transformace (*Iwatani M, 2006*).

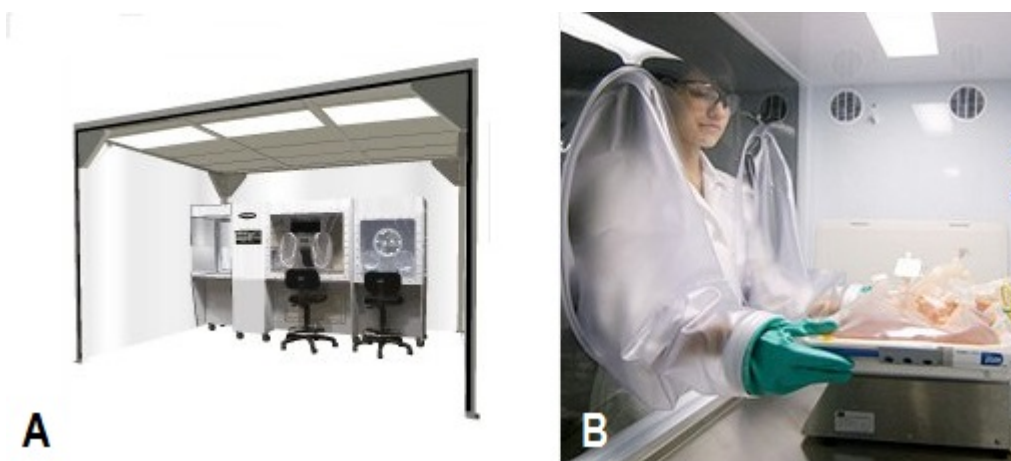
Obr. 9 – Pytlík R, 2011. Robotizované zařízení Tecan Cellerity.



Obr. 10 – systémy Tecan využívají láhve RoboFlask® Corning.



Obr. 11 – manuální systémy pro GMP přípravu buněčných produktů. A – Xvivo Biosciences, celkový pohled, B – Xvivo Biosciences, detailní záběr na pracovníka manuálního systému.



Vitrifikaci odbudeme několika větami. Tato metoda spočívá v extrémně rychlém zmražení buněk v několikamolárním roztoku CPA (např. 6-8 M DMSO). Buňky přitom přichází do přímého styku s tekutým dusíkem, což znamená riziko mikrobiální kontaminace (*Aspergillus*, virus hepatitidy B – **Fountain G, 1997; Iwatani M, 2006**). Navíc je vitrifikace vhodná pouze pro zamrazování malých buněčných objemů, například oocytů (**Song YS, 2010**), vyžaduje poměrně značnou zručnost a v kryoprezervaci hMSC se používá minimálně (**Moon JH, 2008**).

Standardní metodou kryoprezervace zůstává pomalé mražení, preferenčně za kontrolovaného poklesu teploty ( $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), tedy podobné, jako se užívá k mražení hematopoetických progenitorových buněk před autologní či alogenní transplantací. Kryoprotektivní agens jsou používány v nízkých koncentracích (například 5-10% DMSO). Yong prokázal, že 5% DMSO je stejně dobré jako 10%, s nižší toxicitou (**Yong KW, 2015a**), a hlavně je možno ho použít pouze se samotným kultivačním médiem, nikoli s fetálním telecím sérem, jak se provádělo či snad ještě provádí na jiných pracovištích (**Miranda-Sayago JM, 2012**). Byla ovšem vyvinuta i jiná kryoprotekční agens (trehaloza, polyvinylpyrrolidon), které buněčnou membránu nepřestupují a mají být méně toxické (**Thirumala S, 2010a, Thirumala S, 2010b, Janz Fde L, 2012**). Nicméně je zajímavé, že viabilita MSC kryoprezervovaných s těmito CPA je podstatně nižší než s DMSO (**Thirumala S, 2010a, Janz Fde L, 2012**).

Podstatnou otázkou je, do jaké míry kryoprezervace ovlivní základní vlastnosti MSC, jako jejich viabilitu, schopnost další proliferace, zachování diploidního karyotypu, stabilitu genové exprese, zachování imunomodulačních schopností a multidiferenčního potenciálu. Co se týče viability hMSC, je standardně sledována trypanovou modří, barvením na annexin V/propidiumjodid nebo barvením na acetometoxy derivát kalceinu (calcein AM/propidiumbromidová esej). Všechny tyto metody potvrzují viabilitu rozmražených MSC nad 75% za předpokladu, že je v kryoprezervačním médiu

použit dimethylsulfoxid (*Thirumala S, 2010a, Thirumala S, 2010b, Ginis I, 2012; Janz Fde L, 2012*). Proliferační křivky rozmražených buněk se rovněž neliší od buněk nezamražených (*Gonda K, 2008; De Rosa A, 2009; Zhang HT, 2011*). Kupodivu, žádná z uvedených prací nesledovala schopnost tvorby CFU-F jako měřítko možné ztráty klonogenní kapacity v důsledku kryoprezervace.

Co se týče karyotypové stability, nebylo prokázáno, že by byla ovlivněna kryoprezervací (*Angelo PC, 2012*). Nicméně DMSO má schopnost působit epigenetické změny, které rovněž mohou vést k maligní transformaci (*Iwatani M, 2006*). Toto riziko je konkrétně u hMSC pokládáno za nízké, ovšem je dobře znám vliv DMSO na prediferenci hMSC do neurálních buněk, což pravděpodobně probíhá rovněž epigenetickými mechanismy (*Woodbury D, 2000*).

Co se týče genové exprese, je situace složitější. Hoogduijn prokázal, že změny globální exprese v lidských ADSC po rozmražení jsou pouze malé, v rámci interindividuální variability. Ovšem po přesazení do plicního mikroprostředí (zvoleno proto, že velká část MSC se po infusi vychytává v plicích) dochází po dvou hodinách k výrazné změně genové exprese, zejména co se týče genů některých imunologických drah (*Hoogduijn MS, 2016*). To může mít roli na imunomodulační vlastnosti hMSC, které skutečně jsou po rozmražení poškozené, ovšem mohou se restituovat po několikadenní *in vitro* kultivaci (*Francois M, 2012, Moll G, 2014*). Užití kryoprezervovaných buněk těsně po rozmražení může být jedním z důvodů neúspěchu přípravku Prochymal © v léčbě akutní a chronické GvHD (*Galipeau J, 2013*).

Stejně tak se dostupná literatura shoduje v tom, že v průběhu zamražení nedochází k výrazným ztrátám "kmenovosti" MSC (*Angelo PC, 2012*) ani k poškození schopnosti multilineární diferenciaci (*Janz Fde L, 2012; Miranda-Sayago JM, 2012; Al-Saqi SH, 2015*). Je však nutno mít na paměti, že až na výjimky se jednalo pouze o formální *in vitro* eseje, které nemusí být relevantní pro chování buněk *in vivo* a že vliv zamražení může být rozdílný na MSC získaných z různých tkání (*Al-Saqi SH, 2015*). Jamesova práce (*James AW, 2011*) však poškození schopností osteogenní diferenciaci připouští. Stejně tak bylo prokázáno, že v důsledku zamražení dochází u MSC k poškození cytoskeletu, tím k poškození schopností adheze na extracelulární matrix a tudíž i k poškození jejich homingu (*Ghinnaduari R, 2014*). Celkem z uvedeného vyplývá, že mražení MSC je bezpečné, nevede k neakceptovatelným ztrátám buněk a snad ani k výraznému poškození jejich charakteristik a jejich terapeutického potenciálu, ale k definitivnímu posouzení těchto otázek je nutný další výzkum.

### 1.5.6. MSC a jejich využití v kostní a kosterní regeneraci

Východiska pro užití MSC v kostní a kosterní regeneraci jsou jasná a byla hojně diskutována v předchozích kapitolách. Existuje rovněž celá řada preklinických prací, které zkoumaly schopnost zvířecích i lidských MSC regenerovat poškozenou kostní tkáň. Existuje rovněž nepřehledné množství prací zabývajících se konstrukcí biomimetických buněčných lešení (scaffoldů) a osazováním těchto scaffoldů MSC. Poslední zmíněná oblast výzkumu je sice z

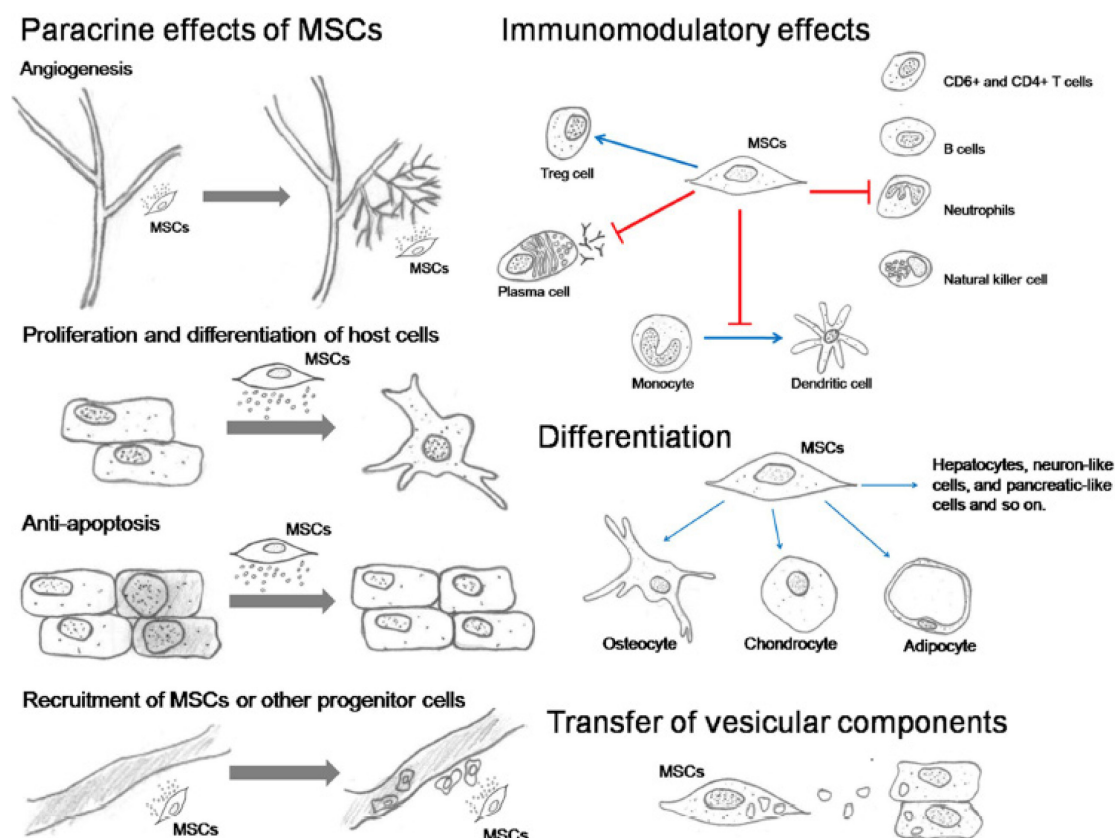
hlediska mojí práce marginální, ale vzhledem k užití takovýchto produktů tkáňového inženýrství v preklinickém výzkumu jí nemohu zcela ignorovat.

Jedna z prvních experimentálních prací hodnotící schopnosti MSC v léčbě kostních defektů byla publikována v roce 1998. Bruder v ní srovnával schopnosti hojení kritického segmentálního femorálního defektu u psů. Dva centimetry dlouhý defekt byl buď ponechán bez léčby, nebo vyplněn osteokeramickým cylindrem samotným nebo osazeným MSC. U psů léčených implantátem s buňkami došlo k výrazně zlepšenému hojení kostního defektu než u psů, kteří dostali implantát bez buněk (**Bruder SP, 1998**). Tato studie vedla k celé řadě dalších, i když byly prováděny na menších zvířecích modelech. V některých z nich byly užity buňky nemanipulované (**Liu Y, 2006**), v jiných však prediferencované (**Petite H, 2000; Yamada Y, 2004**), geneticky upravené (**Tsuchida H, 2003**) či potransplantačně stimulované růstovými faktory (**Akita S, 2004**). Zkoumání obdobných schopností u lidských MSC je možno na imunodeficientních hlodavcích, převážně na potkanech (myši jsou příliš malé). Tyto práce prokázaly, že i lidské hMSC jsou schopné hojit kostní defekty (**Peterson B, 2005; Jager M, 2007; Yoon E, 2007; Cuomo AV, 2009; Liu G, 2010; Gen W, 2013; Suenaga H, 2015; Zigdon-Gilad H, 2015**). MSC mohou napomáhat k hojení kosti jednak přímými mechanismy, protože *in vivo* jsou mobilizovány do místa poranění, kde napomáhají hojení kosti intramembranózní či enchondrální osifikací, s ohledem na svou zralost (**Tortelli F, 2010**). Současně však napomáhají vaskulogeneze prostřednictvím sekrece růstových faktorů (**De Luca A, 2011**) a utlumují produkci zánětlivých cytokinů jako je TNF-alfa, které způsobují mimo jiné zvýšenou osteoklastogenezi a tím zhoršují novotborbu kosti (**Alblowi J, 2009; Granero-Molto F, 2009**). Na hojivém efektu se může podílet též stimulace makrofágové aktivity nebo transfer mitochondrií (**Spees JL, 2006; Chen L, 2008**). Komplexní působení MSC v kostním hojení je znázorněno na **Obr. 12**.

Co se týče bezpečnosti léčby pomocí hMSC, od roku 1995 bylo léčeno zhruba 3000 pacientů v různých indikacích a léčba je pokládána za bezpečnou (**Quarto R, 2001; Jin Shao J, 2015**), i když jsou jisté obavy z možnosti jejich diferenciaci do nevhodných buněk na nevhodných místech (**Tasso R, 2013**). Co se týče jejich efektivity v ortopedických indikacích, výsledky jsou povzbuzující.

Jedno z prvních použití hMSC v léčbě kostních segmentálních defektů u člověka bylo publikováno v roce 2001 (**Quarto R, 2001**). U třech pacientů s kritickým defektem délky 4-7 cm byly do místa defektu implantovány keramické scaffoldy s hMSC. Podání buněk bylo bez komplikací a defekty se hojily. V roce 2004 publikoval Kitoh jinou sérii tří pediatrických pacientů léčených distrakční osteogenezi spolu s podáním MSC a plazmy bohaté na destičky (PRP) pro tibiální achondroplázii či kongenitální tibiální pseudoartrózu (**Kitoh H, 2004**). Buňky byly *in vitro* prediferencovány směrem do osteoblastové linie. PRP obsahuje celou řadu růstových faktorů, včetně faktorů vaskulogenních (**Oryan A, 2016**). Podání hMSC s PRP bylo bezpečné a za tři roky byla stejnou skupinou publikována retrospektivní srovnávací studie pacientů, u nichž byly podány

Obr. 12 – Jin Shao J, 2015. Možné mechanismy, kterými transplantované MSC přispívají k hojení kosti. Parakrinní efekt MSC zahrnuje stimulaci angiogenezy, ochranu jiných buněk před apoptózou, urychlení migrace endogenních MSC nebo jiných progenitorových buněk a stimulaci jejich proliferace a diferenciaci. Imunomodulační efekty pak zahrnují inhibici proliferace a deaktivaci neutrofilů, NK buněk, B a T lymfocytů s výjimkou T-regulačních buněk, jejichž proliferaci stimulují. MSC rovněž zabraňují maturaci dendritických buněk a suprimují sekreci imunoglobulinů plazmatickými buňkami. K tomu přispívá přímý diferenciační potenciál a schopnost ovlivnění okolních buněk prostřednictvím transferu mitochondrií či sekrecí miRNA a proteinů.



buňky s PRP do místa distrakční osteogenezy s pacienty, kterým buňky podány nebyly. Hodnoceno bylo celkem 92 kostí u 46 pacientů (32 kostí, tj. 16 nemocných bylo léčených s buňkami a 60 kostí u 30 nemocných bylo léčeno konzervativně). Ve skupině léčené buňkami došlo ke zlepšení indexů hojení kosti, jejich zrychlení a k úbytku komplikací statisticky významným způsobem (*Kitoh H, 2016*).

Randomizovaných studií hMSC v ortopedických indikacích je však málo. Kim et al. v roce 2009 publikovali studii 64 pacientů se špatně se hojícími nekomplikovanými frakturami, 31 z nich bylo léčeno hMSC prediferencovanými do osteogenní linie ( $1.2 \times 10^7$  buněk) a 33 pacientů tvořily kontroly. Podání hMSC výrazně zlepšovalo tvorbu svalku ve skupině léčené buněčnou terapií (*Kim SJ, 2009*). Dále bylo publikováno čtyři randomizované studie srovnávající léčbu počáteční fáze nekrózy hlavičky femuru se standardní léčbou, kterou byla dekompresní operace (*Gangji V, 2005; Marker DR, 2008; Liu D, 2012; Zhao D, 2012*). V metaanalýze těchto studií (celkem 219 pacientů) bylo zjištěno snížení

rizika progresu o 89% ( $p < 0.01$ ) u skupiny léčené hMSC oproti kontrolám a rovněž ke zlepšení některých kvantitativních ukazatelů (**Li X, 2014**).

Postavení hMSC v hojení kostních defektů je tedy podobné jako postavení BMMC. Klinických studií je málo a randomizovaných ještě méně. Léčba nekrózy hlavičky femuru pomocí hMSC je s největší pravděpodobností účinná, ale i zde platí, že dosavadní výsledky je třeba ověřit velkou randomizovanou studií, nejlépe dvojitě zaslepenou a kontrolovanou placebem. Jinými slovy, i u pacientů léčených konvenčně je třeba provést sber BMMC a kultivaci hMSC, poté by pacienti randomizovaní do ramene se standardní léčbou dostali pouze placebo, které by však bylo k nerozeznání od buněčného preparátu a pacient ani lékař by nevěděl, do jakého ramene je ten který objekt přiřazen. Kromě toho, že jen takto by se zamezilo podvědomému zvýhodňování pacientů léčených buněčnou terapií, by bylo možno též provést srovnání hMSC vykultivovaných v obou skupinách co se týče počtu, klonogenní kapacity, rychlosti růstu a funkčních charakteristik a tím napomoci k vysvětlení eventuálních léčebných rozdílů mezi pacienty léčenými buněčnou terapií a kontrolami (viz např. **Heeschen C, 2004**).

Další otázkou je pochopitelně manipulace s hMSC *ex vivo*. Jak již bylo výše uvedeno, i když hMSC různých vlastností nelze rozlišit dle běžně používaných kritérií, jejich funkční stav závisí na způsobu kultivace, počtu pasáží (méně je více), eventuální prediferenciaci či kryoprezervaci a dalších faktorech. Vlastnosti hMSC může ovlivnit i tak banální věc jako je splývavost buněčných kultur při sklizni (**Ren J, 2015**). Samostatnou otázkou pak je význam buněčných scaffoldů a optimalizace jejich složení pro hojení kosti. Faktory, které je nutno vzít do úvahy v ortopedických indikacích hMSC, jsou přehledně uvedeny ve starší, ale velmi podrobné práci (**Eslaminejad MB, 2011**).

Dnešní stav použití buněčné terapie pomocí hMSC v ortopedických indikacích tedy odpovídá postavení buněčné terapie v jakékoli jiné indikaci. Vezmeme-li očekávání, s nimiž jsme náš výzkum začínali před patnácti lety, jedná se o jednoznačné zklamání.



## 2. Hypotézy

### 2.1. Terapeutické užití hMSC v regenerativní medicíně bez *in vitro* expanze v rámci koncentrátů mononukleárních buněk z kostní dřeně (BMMC).

1. intraarteriálně podané BMMC jsou schopny proniknout do ischemického myokardu či kosterního svalu kolaterálním či mikrovaskulárním řečištěm.
2. intraarteriálně podané BMMC jsou schopny zachránit tzv. hibernovaný myokard (přechodnou zónu mezi nekrózou a plně vaskularizovaným myokardem), zlepšit ejekční frakci a zabránit remodelaci levé komory srdeční v případě rozsáhlých infarktů myokardu).
3. intraarteriálně podané BMMC jsou schopné ulevit v bolestech pacientům s ischemickou chorobou dolních končetin a zlepšit hojení ischemických defektů v populaci nediabetických i diabetických pacientů a tím zlepšit jejich kvalitu života.

### 2.2. Vývoj nových způsobů kultivace hMSC pro užití v regenerativní medicíně

1. Růstové faktory samotné či v kombinaci po přidání do základního média umožní kultivovat hMSC buď ve zcela bezsérovém prostředí nebo v prostředí s lidským sérem.
2. Růstové faktory umožní získání dostatečného množství hMSC při menším počtu pasáží.

### 2.3. Vlastnosti hMSC pěstovaných v kultivačním médiu s lidským sérem a suplementy

1. Schopnosti růstu a diferenciaci hMSC se budou lišit s ohledem na způsob jejich kultivace. Vzhledem k přidání suplementů je možno očekávat, že buňky kultivované s nimi budou růst rychleji než buňky kultivované bez nich.
2. Profily genové exprese hMSC se budou lišit s ohledem na způsob jejich kultivace.
3. V kulturách hMSC nebude v průběhu kultivace docházet k cytogenetickým abnormalitám.
4. Lidské MSC kultivované novým způsobem budou podporovat krvetvorbu nejméně stejně dobře, jako hMSC kultivované klasickým způsobem.
5. Za předpokladu dobré schopnosti osteogenní diferenciaci budou hMSC pomáhat novotvorbě kosti v uměle vytvořeném segmentálním femorálním defektu u pokusných zvířat.
6. Získané hMSC budou bezpečné při podání do pokusných zvířat.
7. Získané hMSC je možno po zamražení dlouhodobě skladovat.

### 3. Cíle práce

1. Ověřit, zda hrubý přípravek BMSC z kostní dřeně může napomáhat regeneraci ischemického srdečního či kosterního svalu či léčbě ischemické dolní končetiny.
2. Vyvinout co nejjednodušší a nejrychlejší způsob kultivace hMSC, pokud možno bez použití zvířecího séra a jiných zvířecích bílkovin.
3. Zjistit, do jaké míry se budou hMSC vypěstované novým způsobem lišit od hMSC pěstovaných s fetálním telecím sérem co se týče diferenciační kapacity a profilů genové exprese.
4. Zjistit, do jaké míry budou hMSC vypěstované novým způsobem schopné podporovat krevetvorbu.
5. Zjistit optimální postup kryoprezervace hMSC pro pozdější použití a jejich proliferační schopnosti po rozmražení.
6. Zjistit, zda nově vyvinutý postup pro kultivaci hMSC je bezpečný a účinný v preklinickém modelu na imunodeficientních zvířatech.
7. Zjistit, zda se nově vyvinutý postup pro kultivaci hMSC podaří dovést do stadia klinické studie.



## 4. Metodika

### 4.1. Získávání materiálu pro přípravu BMMC a pro kultivace hMSC.

Metodika získání BMMC je popsána v pracích **Pěnička M, 2007** a **Chochola M, 2008**. Stručně, pro přípravu autologního BMMC produktu byly lidské mononukleární buňky odebírány v analgosedaci či celkové anestezii. Byly provedeny vícečetné punkce obou lopat kostí kyčelních a dřeňová krev byla odebrána do systému Bone Marrow Collection Kit with Pre-Filter and Inline Filters (Baxter, Deerfield, IL, USA). Pacienti v obou studiích podepsali informovaný souhlas v souladu s Helsinskou deklarácí. Studie byly schváleny lokálními etickými komisemi VFN a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FN KV). Pacienti byli odebíráni a léčeni ve VFN (1, 2) či ve FN KV (1), zpracování BMMC probíhalo ve všech případech na Ústavu hematologie a krevní transfuse Praha (ÚHKT).

Popis postupu při získávání kostní krve pro kultivaci hMSC *in vitro* byl popsán v publikacích **Novotová E, 2003** a **Pytlík R, 2009**. Zdrojem kostní krve byli pacienti podstupující odběr kostní dřeně z důvodu podezření na hematologickou malignitu či z důvodu dříve zjištěné hematologické malignity v rámci tzv. stagingu (zjišťování rozsahu onemocnění). V počátečních fázích výzkumu, kdy šlo o zavedení metod a optimalizaci léčebného postupu, byli odebíráni pacienti bez ohledu na typ onemocnění, postižení kostní dřeně či fázi léčby. V pozdějších stadiích výzkumu, kdy šlo o přesnější charakterizaci hMSC připravených novým způsobem a o preklinické *in vivo* experimenty, byli odebíráni pouze pacienti s lymfoidními malignitami u nichž pravděpodobnost postižení kostní dřeně nepřesahovala 50% a to vždy předtím, než dostali jakoukoli léčbu. Pacienti v rámci jednotlivých projektů podepsali informovaný souhlas s odběrem vzorku v souladu s Helsinskou deklarácí, včetně souhlasu s eventuálním genetickým vyšetřením vzorku. Jednotlivé projekty byly schváleny místní etickou komisí VFN. Kostní krev byla odebrána jednorázově, po punkci lopaty kosti kyčelní v místním znecitlivění či analgosedaci, v množství 10 ml a okamžitě smíchána se stejným objemem Hanksova pufovaného solného roztoku (HBSS) se třemi kapkami heparinu.

### 4.2. Zpracování BMMC produktu pro klinické aplikace.

Podrobný popis zpracování buněčného produktu je uveden v práci **Chochola M, 2008**. Ve stručnosti, po filtraci kostní krve z odběrového vaku do transportního a zpracovacího vaku, kostní krev byla předána na Oddělení buněčné terapie Ústavu hematologie a krevní transfuse, kde byla prováděna opakovaná sedimentace erytrocytů po přidání Gelofusinu (B. Braun, Melsungen, Německo). Supernatant byl opakovaně zpracováván až do získání přibližně 30 ml mononukleární frakce BMMC v autologní plasmě.

### 4.3. Kultivace hMSC *in vitro*

Metodika klasické kultivace hMSC s fetálním telecím sérem byla převzata z práce **Minguell JJ, 2001** s určitými úpravami, které jsou popsány ve výše uvedených pracích **Novotová 2003** a **Pytlík, 2009**. V krátkosti, dřeňová krev v HBSS byla navrstvena v 50 ml zkumavce na 10 ml roztoku Ficoll-Paque PLUS a centrifugována při 2500 g po dobu třiceti minut. BMMC z rozhraní byly resuspendovány v 10 ml kultivačního média (IMDM či alfa-MEM), spočteny na hemocytometru a rozesazeny v počtu  $10^5 - 7.5 \times 10^6$  do 75 cm<sup>2</sup> plastových kultivačních lahví. Kultivační médium sestávalo z alfa-MEM + 20% FCS + 2 mM glutaminu + antibiotické směsi (penicilin + streptomycin ± amfotericin B). V počátečních experimentech bylo zjištěno, že množství FCS lze snížit ze 20% na 10% bez ztráty kultivační efektivity, pak již byla stabilně užívána tato koncentrace. K první výměně média mělo dle práce **Minguell JJ, 2001** dojít 3 dny po zahájení kultivace, společně s odmytím neadherentních buněk. Na základě nabytých zkušeností a též z organizačních důvodů (víkendy) jsme nakonec neadherentní buňky odmývali po 24 hodinách. Médium bylo nejprve vyměňováno dvakrát týdně, ale zjistili jsme, že jednotýdenní výměna je zcela dostačující. Kultury byly dále sledovány 2x týdně pod inverzním mikroskopem. Po dosažení stavu, v němž se jednotlivé kolonie dotýkaly, byly buňky sklizeny pomocí EDTA-trypsinu.

Ke studiu klonogenní kapacity či schopnosti tvorby kolonií (CFU-F) jsme použili modifikovaný protokol z práce **Colter DC, 2000**, opět s jistými úpravami. Ve výchozí práci byly hMSC po napěstování rozesazovány v počtu 0,5, 1,5, 3 a 6 buněk na cm<sup>2</sup> ve 100 mm kultivačních miskách (povrch 60 cm<sup>2</sup>). Colter pozoroval, že při vyšších koncentracích je počet CFU-F relativně menší. 0,5 buněk/cm<sup>2</sup> je skutečně velmi nízká koncentrace pro praktické užití a naše výsledky byly tudíž nekonzistentní. Používali jsme tedy koncentrace 1,5, 3, 5 a 10 buněk/cm<sup>2</sup>. Později jsme v některých experimentech používali pouze jednu koncentraci (3 buněk/cm<sup>2</sup>). Kultivace probíhala po dobu 2 týdnů. Po ukončení kultivace byly buňky fixovány alkoholem a obarveny krystalovou violetí. Jako CFU-F byly počítány buněčné agregáty větší než 2 mm v průměru.

Při optimalizaci růstu hMSC bez zvířecího séra jsme použili zpočátku alfa-MEM s 10% lidským sérem a suplementy podle práce **Gronthos S, 1995**, tj. askorbát, dexamethason, inzulin, EGF a PDGF-BB. Dále byly postupně přidávány FGF-2 a M-CSF (**Tsutsumi S, 2001; Jin-Xiang F, 2004**). Nakonec bylo médium alfa-MEM zaměněno za médium CellGro™ For Hematopoietic Cells (CellGenix, Freiburg, Německo). Definitivní kultivační postup je popsán ve studii **Pytlík, 2009** jakož i v českém patentu 301 148 (Věstník č. 46/2009) a v evropském patentu EP 1 999 250, viz **Přílohy**. V dalších výzkumech jsme zjišťovali relativní význam jednotlivých suplementů jejich postupným vyřazováním z kultivačního média (**Stehlík D, 2012**). Nakonec jsme zaměnili research-grade suplementy a růstové faktory za clinical-grade přípravky a vynechali antibiotika.

#### 4.4. Studium diferenciačních schopností MSC.

Metodika diferenciačních experimentů vychází z publikace **Miguell JJ, 2001** a byla mírným způsobem modifikována (viz práce **Pytlík et al, 2009** a patenty český a evropský, jak uvedeno výše).

Stručně řečeno, pro indukci osteogeneze bylo použito médium alfa-MEM s 10% fetálním telecím sérem, 10 mmol beta-glycerolfosfátem, 0.1 umol dexamethasonem a 0.5 mmol askorbové kyseliny. Médium bylo měněno 2x týdně po dobu čtyř týdnů. Akumulace kalcia byla prováděna von Kossovým barvením a exprese alkalické fosfatázy byla prováděna cytochemicky. Pro adipogenní diferenciaci jsme používali dvoukolové indukční/udržovací metody, kde indukce byla prováděna v alfa-MEM s 10% fetálního telecího séra, 1 umol dexamethasonu, 10 mg/l insulinu, 0.5 mmol 3-isobutyl-1-metyl xantinu. Udržovací médium tvořil pouze alfa-MEM s fetálním telecím sérem a inzulinem. Indukční a udržovací médium se střídaly 2x týdně po dobu 3-4 týdnů. Barvení na adipogenní vakuoly bylo prováděno olejovou červení. Pro chondrogenní diferenciaci byly použity mikropolety MSC (vždy  $10^6$ ) na dně kónické zkumavky kvůli udržení hypoxických podmínek. Médium tvořily alfa-MEM či CellGro™, suplementované 100 umol dexamethasonem, 6.25 mg/l inzulinem, 6.25 mg/l transferinem, 6.25 ug/l seleniem, 5.35 mg/l linoleovou kyselinou a 1.25 mg/ml bovinním sérovým albuminem..

#### 4.5. Studium povrchových antigenů MSC

Metodika je uvedena v pracích **Pytlík R, 2009; Stehlík D, 2012** a **Pytlík R, 2017**.

V práci **Pytlík R, 2009** byly povrchové znaky analyzovány na Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK. Použity byly následující protilátky: CD11b FITC, CD11c FITC, CD14 FITC nebo PE, CD18 PE, CD29 PE, CD34 PE, CD44 FITC, CD45 FITC nebo PE, CD49a FITC, CD49c FITC, CD49d FITC, CD49e FITC, CD63 PE, CD71 FITC, CD90 FITC, CD105 FITC nebo PE, CD106 PE, CD117 PE, CD166 PE, CD235a PE, biotinylované anti-ALP, CXCR4 PE, HLA-A, B, C FITC, HLA DR, DP, DQ PE. Dále byl použit streptavidin PE k vizualizaci vazby alkalické fosfatázy a izotypové kontroly (IgG1 FITC, IgG1 PE, IgG2b FITC, IgG2b PE a IgG1 PE-Cy5). Analýza byla provedena na přístroji FACSCalibur (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, California, USA). Buňky CD45<sup>neg</sup>/CD235a<sup>neg</sup> byly považovány za MSC. Pozitivita byla hodnocena jako vyšší exprese než horních 0.5% exprese izotypových kontrol. Data byla hodnocena podle programu FCS 2.0 (FACS Diva software, BD Biosciences). Výtěžky hMSC počítány jako procento buněk CD45<sup>neg</sup>/CD235a<sup>neg</sup> násobeno celkovým počtem sklizených buněk

V práci **Stehlík D, 2012** byly výtěžky hMSC počítány jako procento buněk CD45<sup>neg</sup>/CD235a<sup>neg</sup> násobeno celkovým počtem sklizených buněk, podobně jako v práci **Pytlík R, 2009**. Ke stanovení kostní diferenciace byly hMSC barveny biotinylovaným antiBMP-2 a antiBMP-7 (detekce streptavidinem FITC), dále anti-osteokalcinem PE a biotinylovaným anti-ALP. Jako hMSC byly pokládány

buňky CD45 negativní (protilátka antiCD45 PE-Cy5). Stanoveny byly následující panely:

- anti-BMP2 (detekce pomocí streptavidinu FITC), anti-osteokalcin, antiCD45
- anti-BMP7 (detekce pomocí streptavidinu FITC), anti-osteokalcin, antiCD45

Měření a hodnocení bylo provedeno stejným způsobem, jak je popsáno v předchozím odstavci. Práce probíhaly na Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK.

Flowcytometrické analýzy ve studii **Pytlík R, 2017** byly prováděny v laboratoři CLIP na Klinice dětské hematologie a onkologie 2. LF UK v Praze a FN Motole, kde je metoda průtokové cytometrie pro hMSC certifikována pro klinické užití. Po promytí fosfátovým puforem obohacený o 0,5% (w/v) bovinní sérový albumin byly buňky inkubovány s následujícími konjugovanými monoklonálními protilátkami: anti-CD3 APC, anti-CD19 PE-Cy7, anti-CD73 PE, anti-CD90 APC, anti-CD16 PE, anti-CD45 PerCP, anti-CD105 FITC, a anti-CD235a FITC. klon HIR2, vše od Exbio Praha, a.s., Vestec, Czech Republic. Ke zhodnocení byl použit LSR II cytometr se standardním modrým laserem, upgradovaným červeným diodovým laserem, fialovým diodovým laserem a OPLS žlutozeleným laserem a Canto II cytometr vybavený standardním modrým laserem, červeným laserem a fialovým laserem. Data byla exportována do FCS 3.0 (FACS Diva software, BD Biosciences) a analyzována FlowJo softwarem (Treestar, Ashland, OR, USA). Buňky byly klasifikovány jako hMSC, pokud byly CD105, CD90, a CD73 pozitivní a CD45, CD19, CD16 a CD3 negativní (**Dominici M, 2006**).

## 4.6. Stanovení genové exprese MSC

Lidské MSC kultivované ve standardních podmínkách (alfa-MEM + FCS) byly srovnávány s hMSC kultivovanými v CellGro™ + lidské sérum + suplementy. RNA z buněk pěstovaných těmito způsoby byla extrahována standardní fenol-chloroformovou metodou. Kvalita RNA byla měřena pomocí přístroje Nanodrop. Tyto práce proběhly na 1. interní klinice 1. LF UK a VFN. Expres jednotlivých genů byla poté stanovena na platformě Illumina. Tato analýza byla provedena v Institutu molekulární genetiky AV ČR.

Pro analýzu bylo použito 2 chipových sad Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChip Kit. Každá sada obsahovala 12 expresních polí, celkem tedy bylo provedeno 24 experimentů. Jednotlivé expresní experimenty byly rozděleny do několika skupin a byly zjišťovány rozdíly v expresi jednotlivých mRNA mezi dvojicemi skupin. Expresní pole byla nejprve normalizována a poté byly expresní rozdíly zkoumány pomocí t-testu s korekcí na testování mnoha hypotéz (Development Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing, **1**, ISBN 3-900051-07-0). Pro analýzu bylo použito prostředí R-project 1 s využitím balíčků ze zdroje Bioconductor 2 (*Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*, Springer-Verlag, 2005, at <http://www.springerlink.com/content/g26110k024423738/>), především balíku beadarray 3 (**Dunning MJ, 2007**). Při analýze bylo použito také nově vyvíjeného softwaru a metod pro analýzu Illumina expresních polí na úrovni nesumarizovaných sond.

Hladiny cílové mRNA byly vztaženy k hladinám geometrického průměru interních kontrolních genů TBP (TATA - box binding protein), GUSB (Glucuronidase, beta) a RPLPO (large ribosomal protein). Hladina genové exprese byla stanovena relativně ke vzorku cDNA z kontrolní skupiny (hMSC z alfa-MEM + FCS).

Jednotlivé genové skupiny a signální dráhy byly dále studovány pomocí on-line programu **DAVID Bioinformatic Resources 6.7** (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). Diferenciálně exprimované geny byly do funkčních skupin řazeny pomocí Benjaminioho korekce.

Pro nezávislé ověření výsledků diferenciální exprese genů CDH11, CTSK, CTGF, IGFBP3, COL1A1, ARID5B byla použita metoda PCR v reálném čase (qRT-PCR). Tyto práce probíhaly na 1. interní klinice 1. LF UK a VFN. Analýza byla provedena s využitím Taqman Universal PCR Master mix a TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies, Praha, Česká Republika). Vzorky použité ke studiím qRT-PCR byly tytéž, na kterých byly studovány profily genové exprese.

Každý vzorek byl amplifikován ve čtyřech reakcích: v první reakci byla stanovena exprese cílového genu, v dalších třech reakcích byla stanovena exprese 3 různých kontrolních genů. Reakce probíhala ve 20 ul za přítomnosti 9 ul cDNA, 10ul komerčně dodávaného master mixu a 1ul sondy s primery v termocykleru Stratagene Mx3000p (Stratagene, Chemos CZ, Praha). Reakční podmínky byly následující: denaturace 5 min při 95 °C, následovalo 45 cyklů 15 s při 95 °C, 60 s při 60 °C. Všechny reakce byly provedeny v duplikátech.

## 4.7. Cytogenetické studie

Lidské MSC byly kultivovány v alfa-MEM s fetálním telecím sérem nebo v CellGro™ s lidským sérem a suplementy. Zde již bylo použito pouze 6 suplementů, tedy askorbát, inzulin, dexamethason, EGF, PDGF-BB a FGF-2 (bez M-CSF).

Při zavádění metodiky pro kultivaci hMSC k analýze karyotypu jsme vycházeli z práce **Muntión S, 2012**. Mitotické chromozómy pro analýzu získaných chromozómových aberací byly získány sklizní buněk po 18 hodinové kultivaci s kolcemidem (Roche Life Sciences, Indianapolis, Indiana, United States) o koncentraci 0,1 mg/ml, následované hypotonizačním roztokem 0,075 M KCl 20 min při 37<sup>0</sup> C a fixací roztokem methanol : kyselina octová (3 : 1, v/v). Kultury byly zkoumány inverzním mikroskopem ke zjištění optimální doby ke sklizni. Po sklizni a hypotonizaci byly preparáty barveny roztokem Giemsky tj. 5 ml roztoku Giemsa a 90 ml Sörensenova pufru pH 6,8, 8-10 min. Analýza chromozómových zlomů se prováděla u celkově 100 mitóz. U vybraných vzorků byla též provedena analýza pomocí G-bandingu a M-FISH analýza. Ta byla prováděna na preparátech metafázních chromozomů hybridizací s „24XCyte“ probe Kit (MetaSystems™ GmbH Altlussheim, Germany) obsahující kombinovaně značené malovací sondy pro všechny autozomy a gonozomy lidského karyotypu. Po hybridizaci byly preparáty standardně promyty a barveny fluorescenční sondou DAPI (4 , 6-diamidino-2-phenylindole) a zality do Vectashield montovacího média (Vector

Laboratories, Burlingame, CA). K získání obrazu byly použity mikroskop Olympus AX 70 Provis (Olympus, Tokio, Japan) a ISIS M-FISH zobrazovací systém (MetaSystems™ GmbH Altlußheim, Germany).

## 4.8. Kryoprezervace

Kryoprezervační experimenty byly prováděny v rámci projektu NT13531/4 a byly částečně publikovány v práci **Verdánová M, 2014**. Lidské MSC byly kultivovány buď v alfa-MEM s fetálním telecím sérem nebo v CellGro™ s lidským sérem a suplementy. Viabilita byla měřena trypanovou modří na přístroji Cellometer® AutoT4 (Nexcelcom Biosciences, Lawrence, Massachusetts USA) nebo jako počet jader barvených DAPI pozorovaných na fotografiích z fluorescenčního mikroskopu (Eclipse Ti-S, Nikon, Tokyo, Japonsko) pořízených kamerou DSQi1Mc Digital Cameras (dtto). Ve druhém případě byla provedena počítačová analýza pomocí programu Cell Profiler (Broad Institute, <http://www.cellprofiler.org>). Viabilita byla dále měřena pomocí růstu CFU-F kolonií, které bylo prováděno při koncentraci 3 bb/cm<sup>2</sup>.

Pro studium vlivu sericinu (**Aramwit P, 2012, Miyamoto Y, 2012**) na kryoprezervované MSC byly buňky kultivovány v alfa-MEM s fetálním telecím sérem a byla použita média uvedená v **Tab. 3**. Zde uvádíme včetně zkratk, které se dále objeví v oddílu **Výsledky**. Jako kontrolní buňky byla použita osteoblastická kultura SAOS2 kultivovaná v McCoy 5A médiu.

Pro studium vlivu telecího séra a MSC freezing solution byly použity buňky kultivované v alfa-MEM s fetálním telecím sérem nebo v CellGro™ s lidským sérem a suplementy. Použity byly následující mrazící roztoky:

- 90% fetální telecí sérum + 10% DMSO,
- 90% alfa-MEM + 10% DMSO,
- 45% alfa-MEM + 45% fetální telecí sérum a 10% DMSO
- 45% CellGro™ for hematopoietic cells + 45% lidské sérum + 10% DMSO,
- 90% CellGro™ + 10% DMSO,
- MSC Freezing Solution (Biological Industries, Cromwell, CT, USA)

Ve všech kryoprezervačních experimentech byly buňky zamražovány uniformně ve 2 ml kryoprezervačního roztoku v koncentraci 0.5x10<sup>6</sup> buněk na ml. Nejprve proběhlo zamražení na -80°C v CoolCell kontejneru (Biocision, Larkspur, CA), což je plastový kontejner umožňující víceméně kontrolované mražení rychlostí 1°C

**Tab. 3 – Verdánová M, 2014. Média použitá ve výzkumu vlivu sericinu na kryoprezervaci MSC. CM = kultivační médium (tj. alfa-MEM nebo McCoy 5A), DMSO = dimetylsulfoxid.**

Zamražovací médium	Zkratka
Kultivační médium + 10% DMSO + 25% FCS	CM + 10D + 25F
Kultivační médium + 10% DMSO	CM + 10D
Kultivační médium + 10% DMSO + 1% sericin	CM + 10D + 1S
Kultivační médium + 10% DMSO + 5% sericin	CM + 10D + 5S
Kultivační médium + 5% DMSO	CM + 5D
Kultivační médium + 5% DMSO + 1% sericin	CM + 5D + 1S
Kultivační médium + 1% DMSO	CM + 1D

Kultivační médium + 1% DMSO + 1% sericin	CM + 1D + 1S
Kultivační médium + 1% DMSO + 5% sericin	CM + 1D + 5S
Kultivační médium + 1% sericin	CM + 1S
Kultivační médium + 5% sericin	CM + 5S
Pouze kultivační médium	CM
Pouze DMSO	DMSO

za minutu. Takto zamražené buňky byly následně přeneseny do tekutého dusíku (-196°C) a ponechány do další fáze experimentu. Rozmrazování buněk proběhlo v 37°C vodní lázni maximálně po dobu 3 minut a kryoprezervační médium bylo okamžitě rozředěno alfa-MEM, McCoy 5A nebo CellGro™ for Hematopoietic Cells médiem.

## 4.9. *In vivo* preklinické modely

Pro *in vivo* preklinické experimenty k ověření účinnosti a bezpečnosti hMSC kultivovaných v CellGro™ s lidským sérem a suplementy byly použity tři modely:

**I. Heterotopická lokální transplantace do imunodeficientních myší NOD/LtSz-Rag1<sup>null</sup> (podkožní na PLLA scaffoldech).** Metodika je popsána v práci *Pytlík et al, 2009*. Ve stručnosti, scaffoldy byly osazeny hMSC kultivovanými buď v alfa-MEM s fetálním telecím sérem či v CellGro™ s lidským sérem a suplementy. Po osazení scaffoldů byly tyto vloženy do kostního diferenciacního média (viz výše) po dobu čtyř týdnů. Takto prediferencované hMSC na scaffoldech byly pak vloženy podkožně do laterálních částí hrudníku (jeden scaffold na každou stranu). PLLA scaffoldy bez hMSC byly užity jako negativní kontrola. Před implantací scaffoldu byly myši ozářeny celotělově 2 Gy. Po 6-9 týdnech byly myši usmrceny a fixovány 10% formaldehydem. Poly-laktidové scaffoldy byly vyšetřovány histologicky a barveny hematoxylin-eozinem, Massonovým zeleným trichromem a Ladewigovou modifikací Massonova modrého trichromu. Experimenty na zvířatech byly schváleny Odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1. LF UK. Práce na pokusných zvířatech byly prováděny v Centru experimentálních biomodelů 1. LF UK, histologická vyšetření na Ústavu histologie a embryologie LF Hradec Králové.

**II. Heterotopická lokální transplantace do imunodeficientních myší kmene NOD.129S7(B6)-Rag1<sup>tm1Mom/J</sup> (podkožní na plazmatické sraženině).** Na tomto modelu byly prováděny dva druhy studií:

- krátkodobé studie bezpečnosti hMSC kultivovaných v CellGro™ s lidským telecím sérem a suplementy,
- dlouhodobé studie bezpečnosti hMSC kultivovaných v CellGro™ s lidským telecím sérem a suplementy.

Příprava plazmatických sraženin byla stejná jako pro model č. 3 a je popsána v práci *Pytlík R, 2017*. Opět, veškeré studie na zvířatech byly schváleny Odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1. LF UK. Zvířecí experimenty byly prováděny v Centru experimentálních biomodelů 1. LF UK, histologická

vyšetření na Ústavu histologie a embryologie LF Hradec Králové.

Plazmatické sraženiny byly připravovány ze suspenze 360 ul lidské plazmy a 40 ul  $\text{CaCl}_2$ , osazeny hMSC (cílová dávka,  $10 \times 10^6$  na sraženinu) a nasazeny do 24 jamkových kultivačních destiček. Po sražení byly plazmatické sraženiny implantovány do zátylku pokusných zvířat.

**a. Krátkodobé studie bezpečnosti hMSC kultivovaných v CellGro™ s lidským telecím sérem a suplementy.** Cílem těchto experimentů bylo zjistit retenci buněk v plazmatické sraženině v místě aplikace, jejich diseminaci do jiných orgánů a vliv na laboratorní parametry krevního obrazu. Jako pozitivní kontrola pro retenci v místě aplikace byly použity buňky smíšené s preperátem Cem-Ostetic® (Berkeley Advanced Biomaterials, Inc., Berkeley, CA, USA). Cem-Ostetic® je kostní tmel neutrálního pH, které obsahuje biokompatibilní kalciové soli, schválený FDA pro klinické užití. Další kontrolní skupiny byly tvořeny myši, kterým nebylo implantováno nic nebo jim byla implantována plazmatická sraženina bez buněk nebo jim byl podán materiál Cem-Ostetic® bez buněk.

Prvním deseti zvířatům byly buňky podány v rychle eskalovaných dávkách (od  $1.4-14.5 \times 10^6$  hMSC), u ostatních zvířat byla použita dávka  $10 \times 10^6$  hMSC.

Myši měly být původně sledovány po dobu dvou týdnů, ale vzhledem k absenci jakýchkoli nežádoucích účinků bylo u některých jedinců prodlouženo sledování až na šest týdnů. Myším ve dvoutýdenních experimentech byla odebírána krev při implantaci buněk, po 1 týdnu a po 2 týdnech, myším v delších experimentech pak při implantaci a po dvou týdnech až do ukončení experimentu. Myši při dvoutýdenních experimentech byly váženy na začátku a na konci experimentu, při ukončení experimentu byla vážena i slezina.

Po usmrcení zvířat byly parenchymatózní orgány (plíce, srdce, játra, slezina, ledviny) a místo implantátu odeslány na patologické vyšetření, u myší s implantovanými lidskými buňkami byly orgány vyšetřovány na přítomnost lidských buněk protilátkami proti lidskému nestinu a proti lidským mitochondriím.

**b. Dlouhodobé studie bezpečnosti hMSC kultivovaných v CellGro™ s lidským telecím sérem a suplementy.** Dlouhodobé studie byly prováděny na párech ze stejného vrhu. Cílem bylo zjistit přežití zvířat, jejich schopnost breedingu, dále pak tvorbu eventuálních nádorů a přítomnost lidských buněk v místě aplikace sraženiny a v parenchymatózních orgánech. Experimentální skupinu tvořily páry, kterým byly aplikovány hMSC v počtu  $10 \times 10^6$  v plazmatické sraženině, kontrolní skupiny páry, kterým byla aplikována buď pouze plazmatická sraženina nebo byly bez implantace. Páry byly sledovány po dobu 6-10 měsíců.



### **III. Ortotopická lokální transplantace do kritického defektu femuru u imunodeficientních rnu-rnu potkanů.**

Vzhledem k tomu, že Centrum pro experimentální biomodely 1. LF UK nebylo v době provádění experimentů certifikováno pro chov athymických rnu/rnu potkanů, byly experimenty prováděny na Ústavu pro translační výzkum kostí, kloubů a měkkých tkání na Lékařské fakultě Carla Gustava Caruse v Drážďanech. Tamtéž byla prováděna i radiologická měření. Histologická a imunohistochemická vyšetření byla provedena na Ústavu histologie a embryologie LF Hradec Králové. Experimenty byly schváleny Drážďanskou oblastní veterinární komisí a metodika je podrobně popsána v práci *Pytlík R, 2017*).

Athymičtí rnu/rnu potkani (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) byli chováni ve sterilních klecích a dostávali sterilní potravu a vodu do doby, než dosáhli kostní dospělosti (10-14 týdnů). V celkové anestezii byla provedena incize podél levého stehna a tupě byla obnažena diafýza femuru. Na femur byla čtyřmi vruty připevněna kovová dlaha a mezi druhým a třetím vrutem byl vytvořen kritický kostní defekt (cílová délka defektu 5 mm). Do defektu byla vložena plazmatická sraženina s  $10 \times 10^6$  hMSC, připravená výše uvedeným způsobem. Kontrolní skupinu tvořila zvířata s implantovanou sraženinou bez buněk. Defekty pak byla zašity vstřebatelnou tkání a kůže zajištěna staplerem. Myši byly sledovány po dobu 8 až 16 týdnů a hojení defektů bylo sledováno pomocí rentgenu a mikroCT (viz dále). Po 8 nebo 16 týdnech byly potkani usmrceni, femury byly explantovány, fixovány ve formolu a histologicky zpracovány. Stejně tak byly odebrány parenchymatózní orgány (mozek, plíce, srdce, játra, slezina, ledviny), fixovány ve formolu a vyšetřeny histologicky a imunohistochemicky.

Rentgenologické sledování bylo prováděno na přístroji AMX4 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) jednak pooperačně, jednak 8 a 16 týdnů po operaci. Velikost defektu byla hodnocena pomocí ImageJ software ([imagej.nih.gov/ij](http://imagej.nih.gov/ij)). MikroCT s třírozměrnými rekonstrukcemi bylo provedeno na přístroji VivaCT 75 (Scanco, Brüttisellen, Švýcarsko).

Femorální explanty byly fixovány ve 4% formalinu, dekalifikovány v EDTA, dehydratovány a zality do methylnmetakrylátu. Používány byly řezy o tloušťce 3  $\mu$ m. Histologická barvení byla hematoxylin-eozin, Goldnerovo a Malloryho barvení. Dále byla provedena imunohistochemická vyšetření na potkaní aktin, lidský nestin a v některých případech imunofluorescenční detekce lidských mitochondrií. Parenchymatózní orgány byly rovněž fixovány ve 4% formalinu, zality do parafínu a provedené řezy byly 6-7  $\mu$ m silné. Histologická a imunohistochemická vyšetření byla provedena jako u femorálních explantů, u fibroplázie, která byla detekována v myokardu jednoho zvířete, byla navíc užita imunohistochemická barvení na vimentin a CD68.

Histomorfometrická měření a kvantifikace cévní denzity byla provedena na 10 vzorcích z různých oblastí (40 vizuálních polí celkem) na mikroskopu

Olympus BX51 vybaveném digitálním kamerou DP25 a softwarem ImageJ (Fiji, NIH).

## 4.10. Sledování kvality života

Metodika je uvedena v práci **Chochola M, 2008**. Ve stručnosti, použit byl standardní dotazník SF-36 (**Ware JE Jr, 1992**). Dotazník byl vyplněn před transplantací BMMC a rok po ní. Tento dotazník sestává z 36 otázek, které jsou následně sloučené do osmi domén: 1. fyzické punkce, 2. fyzické role, 3. emocionální role, 4. sociální funkce, 5. fyzická bolest, 6. duševní zdraví, 7. vitalita a 8. celkové zdraví. Z nich je možno počítat 2 kompozitní skóre: fyzické (PCS) a mentální (MCS). Kompozitní skóre byla počítána na online NBS kalkulačce ([www.sf-36.org](http://www.sf-36.org)).

## 4.11. Příprava klinické studie hMSC

Za klinickou situací vhodnou ke studii hMSC v kostním hojení jsme pokládali tibiální osteotomii (**Smith TO, 2011**), zejména proto, že při tomto typu ortopedické operace pro artrózu není nutno podávat buňky na nosiči. Před podáním žádosti o klinickou studii byl opakovaně konzultován Státní ústav pro kontrolu léčiv, a to již od doby, kdy byl náš buněčný produkt vyvinut a procházel patentovým řízením. Podání oficiální žádosti o klinické hodnocení mělo proběhnout po testech bezpečnosti a účinnosti produktu.

## 4.12. Statistické zpracování výsledků

Statistická zpracování výsledků byla přizpůsobena vstupním datům. Obecně, kategorické proměnné byly hodnoceny pomocí chí-kvadrát testu a Fischerova přesného testu. U kontinuálních proměnných byly prováděny testy na normalitu rozložení dat (Kolgomonov-Smirnoffův a Lilleforsův test). Normálně rozložená data byla hodnocena pomocí t-testu, ev. párového t-testu (pro dvě skupiny) a pomocí ANOVA (pro více skupin). Data s nenormální distribucí byla hodnocena pomocí Mann-Whitney U-testu (nepárové vzorky, 2 skupiny), Willcoxonova párového testu (párové vzorky, 2 skupiny) a neparametrických obdob testu ANOVA (Kruskal-Wallis). Korelace byly hodnoceny pomocí Pearsonova (při normální distribuci) nebo Spearmanova korelačního koeficientu (při nenormální distribuci) a Výsledky byly pokládány za statisticky signifikantní při hodnotě  $p \leq 0.05$ . Výsledky byly uváděny jako průměry a směrodatné odchylky (při normálním rozložení dat) anebo jako mediány a rozmezí (při nenormálním rozložení dat).

K výpočtům a grafickému znázornění dat byly použity různé verze software SPSS pro Windows (IBM), GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, California, US) nebo Statistica (StatSoft, Tulsa, Minnesota US).

## 5. Výsledky

### 5.1. - Využití nemanipulovaných BMBC v léčbě infarktu myokardu a ischemické choroby dolních končetin

#### 5.1.1. – Studie intrakoronární injekce autologních BMBC u pacientů s velkým předním infarktem myokardu.

Výsledky této studie byly zveřejněny ve studii *Pěnička M, 2007*. Do studie byly zahrnutí pacienti s infarktem myokardu v důsledku okluze proximální části ramus interventricularis anterior (RIA, též left descending coronary artery - LAD), kteří měli primární perkutánní angioplastiku se stentáží od 4 do 24 hod po počátku příznaků a kteří měli ejekční frakci levé komory srdeční sniženou pod 50% s alespoň třemi akinetickými segmenty v povodí uvedené arterie. V rámci studie mělo být randomizováno celkem 60 pacientů v poměru 2:1 k intrakoronární infuze BMBC či standardní léčbě.

Studie byla předčasně zastavena po náboru 27 pacientů. U 17 pacientů randomizovaných k experimentální léčbě byla průměrná ejekční frakce levé komory po infarktu  $38 \pm 7\%$ , u 10 kontrolních pacientů  $39 \pm 4\%$  ( $p = \text{NS}$ ). U experimentálních pacientů byla odebírána kostní krev 4. až 11. den po angioplastice, v průměru  $171 \pm 48$  ml. Výsledný koncentrát BMBC měl objem  $27 \pm 7$  ml, median počtu BMBC v tomto objemu byl  $26.4 \times 10^8$  a medián počtu CD34+ buněk byl  $1.3 \times 10^6$ .

Důvodem předčasného ukončení studie byly dvě život ohrožující komplikace u dvou pacientů v experimentální skupině (jedna septální ruptura a jedna trombóza stentu bezprostředně po odběru BMBC) a nedostatek efektivity. Po roce byla ejekční frakce levé komory v experimentální skupině  $46 \pm 7\%$  a v kontrolní skupině  $49 \pm 13\%$ . V experimentální skupině byla v průběhu této doby nutná revaskularizace u 24% pacientů, v kontrolní skupině u 40% pacientů. Žádný z těchto rozdílů nebyl klinicky signifikantní. K úmrtí došlo u tří pacientů v experimentální skupině (u dvou po výše uvedených komplikacích v souvislosti s experimentální léčbou a u jednoho v důsledku rakoviny žlučovýchodů), žádný pacient z kontrolní skupiny nezemřel. V každé skupině došlo u jednoho nemocného k progresivnímu srdečnímu selhání.

#### 5.1.2 – Autologní intraarteriální infuze mononukleárních buněk z kostní dřeně u pacientů s kritickou ischemií dolních končetin.

Fáze II studie intraarteriální aplikace autologních BMBC u pacientů s kritickou ischemií dolních končetin byla prováděna v rámci grantu ND8092/3 a výsledky byly zveřejněny v publikaci (*Chochola M, 2008*). Dřeňové

mononukleární buňky byly podány celkem celkem do 28 končetin u 24 pacientů. Kritická ischemie dolní končetiny byla definována jako chronická ischemická bolest s nutností pravidelného užívání analgetik po dobu více než dva týdny, s kožními defekty a distální nekrozou v důsledku prokázané obliterativní arteriální choroby a u pacientů s vysokou pravděpodobností amputace končetiny v průběhu 6-12 měsíců, pokud se perfuze končetiny nezlepší.

V průběhu studie bylo postupně zvyšováno množství odebrané kostní krve s cílem zjistit maximální objem, při kterém není nutno podávat transfusi. Z hlediska efektivity byly zkoumány objektivní parametry: hojení defektů, tvorba kolaterálního řečiště pomocí radiologických vyšetření, zlepšování poměru krevního tlaku mezi lýtkem a paží (tzv. ankle-brachial index, ABI) a změny v transkutánní tenzi kyslíku. Ze subjektivních parametrů byl zkoumána změna Fontainova stupně ischemie a kvalita života podle dotazníku SF-36. Charakteristiky pacientů je uvedena v **Tab. 4**.

**Tab. 4 – Chochola M, 2008: charakteristiky pacientů.**

Počet pacientů	24
Muži: ženy	13 v. 11 (54% v. 46%)
Diagnóza:	
ischemická choroba dolních končetin	21 (88%)
thromboangiitis obliterans	3 (12%)
Věk (medián, rozmezí)	68 let (26-85 let)
Body mass index (medián, rozmezí)	25.9 kg/m <sup>2</sup> (20.6-35.3 kg/m <sup>2</sup> )
Diabetes mellitus (2. typu)	15 (62.5%)
Kouření v anamnéze	8 (33%)
Ischemická choroba srdeční v anamnéze	11 (46%)
Cévní mozková příhoda v anamnéze	5 (21%)
Hyperlipidémie	13 (54%)
Chemická sympatektomie	3 (12%)
Počet léčených končetin	28
Fontaine skóre před léčbou	
III	14 (50%)
IV	14 (50%)
Ischemické defekty	14 (50%)
Ankle-arm index (medián, rozmezí)	0.57 (0-1)
TcpO <sub>2</sub> před léčbou (medián, rozmezí, mm Hg)	10 (0-48)

Oproti léčbě infarktu myokardu byly zde odběrové procedury velmi dobře tolerovány. Postupně byl zvyšován objem odebrané kostní krve z 276 ml na 700 ml, ani při největším odebíraném objemu nebylo nutno podávat transfuze (**Tab. 5**). Pacienti byli propuštěni po mediánu hospitalizace 1 den (rozmezí, 1-3 dny) a byla pouze jedna krvácivá komplikace grade II z místa odběru kostní krve.

Kvalita života pacientů dle hodnocení dotazníku byla výrazně lepší před léčbou i po léčbě a to jak co se týče všech osmi domén, tak obou kompozitních skóre (tj. fyzického i mentálního (**Obr. 13**)).

Rok po léčbě byli všichni pacienti naživu, pouze u dvou pacientů bylo nutno provést vysokou amputaci. Jeden pacient zemřel po fraktuře krčku

femuru, 1-leté přežití bez události tedy bylo 92%. Ze 14 ischemických defektů se jich zhojilo 14 (78%, **Obr. 14**). Výsledky hojení ran korelovaly s radiologickými výsledky (**Obr. 15**).

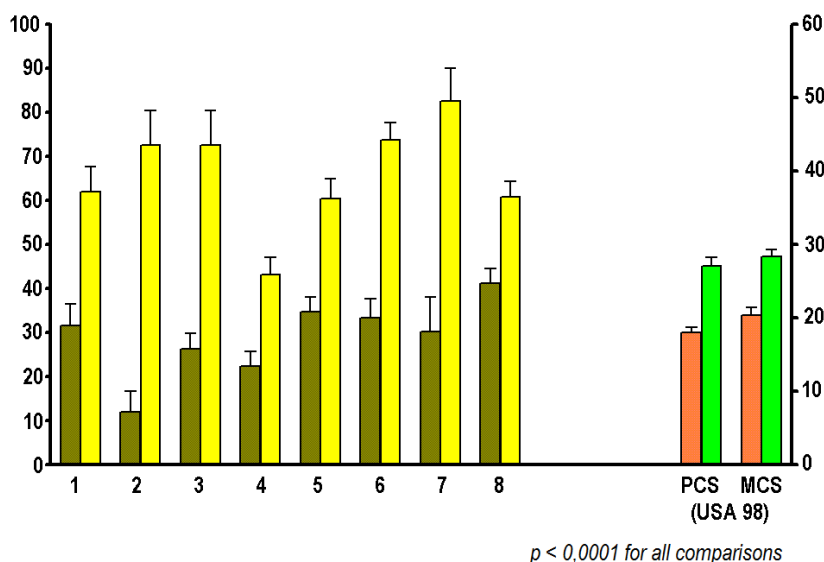
**Tab. 5 – Chochola M, 2008: výsledky odběru a zpracování BMMC. CFU-GM = koloniformní jednotky, granulocyto-makrofágové, BFU-E = burst-forming units (erytroblastové).**

<b>Před zpracováním</b>	
Objem odebrané kostní krve	400 (276-700)
Koncentrace mononukleárních buněk	15.6x10 <sup>6</sup> /ml (4.8-37.5x10 <sup>6</sup> /ml)
Celkový počet mononukleárních buněk	64.3x10 <sup>9</sup> (13.2-131.1x10 <sup>9</sup> )
<b>Po zpracování</b>	
Celkový počet mononukleárních buněk	53.1x10 <sup>9</sup> (15.5-125.8x10 <sup>9</sup> )
Efektivita zpracování	80.8% (44-94.4%)
Procento CD34+ buněk	0.75% (0.12-1.59%)
Celkový počet CD34+ buněk	34.9x10 <sup>6</sup> (4-135.4x10 <sup>6</sup> )
Celkový počet CFU-GM	873 (174-3489)
Celkový počet BFU-E	552 (128-2512)

Z vedlejších výsledků stojí za zmínku zlepšení parciálního tlaku O<sub>2</sub> měřeného na palci dolní končetiny po léčbě, které se týkalo jak diabetických, tak nediatetických pacientů. Naproti tomu zlepšení ankle-arm indexu (poměr krevního tlaku při měření na kotníku a na paži) se týkalo pouze pacientů nediatetiků. Pacienti s diabetem mellitem však vykazovali stejně dobré hojení ran jako pacienti bez diabetu.

V roce 2010 jsme doplnili dlouhodobé sledování pacientů z naší studie. Výsledky byly prezentovány na Transplantologickém sjezdu ve Špindlerově mlýně, ale nebyly fulltextově publikovány. Při mediánu sledování 6.5 roku zemřelo 7 nemocných (33%), mezi nimi oba, kteří měli amputaci do jednoho roku po aplikaci BMMC. Amputace byla provedena u dalších dvou nemocných, nové defekty se objevily na třech končetinách. Zhodnotit se dalo celkem 16 končetin, z toho na sedmi bylo Fontainovo skóre I (bez bolestí), u osmi bylo Fontainovo skóre II (bolesti při námaze) a pouze u jedné Fontainovo skóre IV (trofické defekty). Vzhledem k tomu, že na všech nohou bylo před vstupem do studie skóre III nebo IV, bylo na 15 z hodnocených 16 dolních končetin (tj. na 94% z nich) pozorováno dlouhodobé zlepšení.

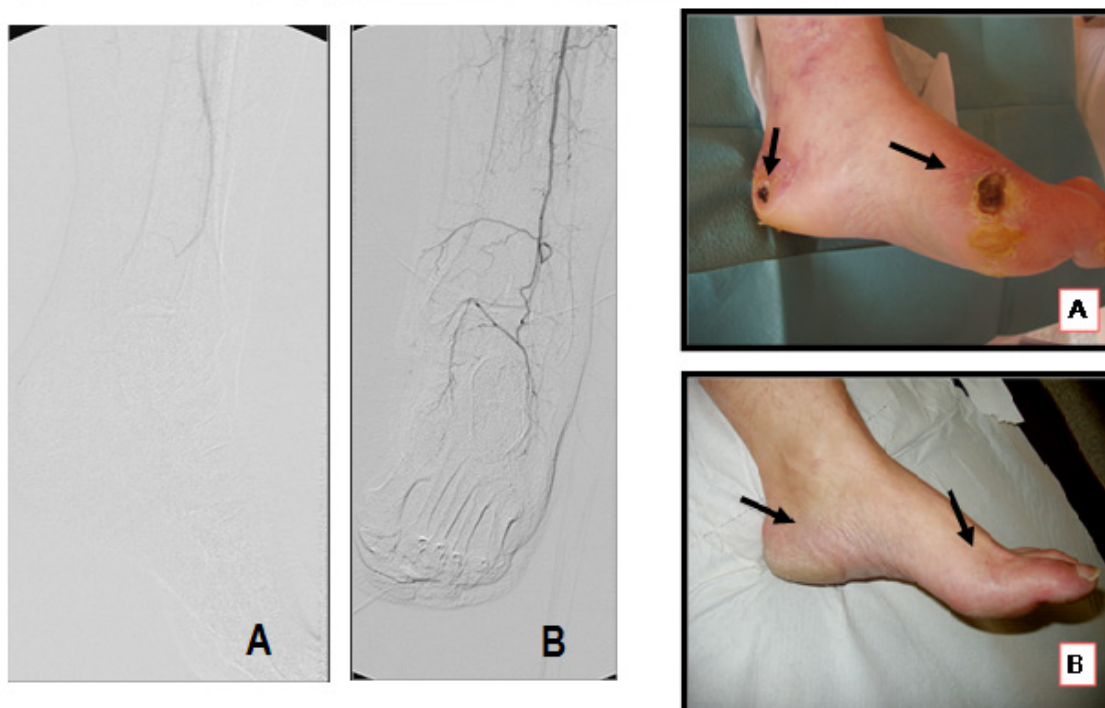
Obr. 13 – Chochola M 2009, výsledky SF-36 dotazníku. Domény 1-8: 1. fyzické punkce, 2. fyzické role, 3. emocionální role, 4. sociální funkce, 5. fyzická bolest, 6. duševní zdraví, 7. vitalita, 8. celkové zdraví. PCS = fyzické kompozitní skóre, MCS = mentální kompozitní skóre. Vztaženo k průměru populace USA v roce 1998. Sloupečky vlevo - před léčbou, sloupečky vpravo - po léčbě. Výsledky jsou statisticky vysoce signifikantní ( $p < 0.00001$  pro všechna srovnání).



Obr. 14 – Chochola M, 2009: rereprezentativní příklad hojení ischemického defektu. A – před léčbou BMMC, B – 6 měsíců po léčbě, C, D – 12 měsíců po léčbě.



Obr. 15 - Srovnání cévního zásobení a stavu defektu na dolní končetině před léčbou (A) a po léčbě (B). Nepublikovaný obrázek.



## 5.2. Optimalizace kultivace hMSC pro klinické užití

### 5.2.1. Zavedení metodiky klasické kultivace hMSC s fetálním telecím sérem a zavedení metodiky trilineární diferenciaci hMSC

Před zahájením experimentů na zrychlení a zlepšení kultivace hMSC bylo nejprve nutno zvládnout techniku klasické kultivace s fetálním telecím sérem. Technika byla zavedena v Laboratoři experimentální buněčné terapie 1. interní kliniky 1. LF UK a VFN. Tato metodika a výsledky získané jejím zavedením byly zveřejněny v publikaci *Novotová et al, 2003*. V této práci jsme studovali koloniformní kapacitu hMSC (CFU-F) u pacientů s hematologickými malignitami v závislosti na infiltraci kostní dřeně. Reprodukovatelnost metodiky byla ověřena párovými odběry vzorků u části pacientů (ze 44 nemocných bylo 17 odebráno oboustranně). Hlavním zjištěním práce bylo, že hMSC u pacientů s chorobami s infiltrací kostní dřeně (tj. chronická lymfatická leukémie, mnohočetný myelom) mají lepší koloniformní kapacitu ve 2. pasáži než pacienti s jinými onemocněními (především difusní velkobuněčný a Hodgkinův lymfom).



## 5.2.2. Nová metodika kultivace hMSC

Zpočátku jsme zkoušeli ve standardním kultivačním médiu (alfa-MEM s fetálním telecím sérem) pouze nahradit fetální telecí sérum za lidské. V alfa-MEM s 10% lidským sérem (autologním či alogenním) však hMSC rostly pomalu a podléhaly spontánní adipogenní diferenciaci (**Obr. 16**).

Přidání pěti suplementů dle Gronthose a Simmonse (**Gronthos S, 1995**) k médiu tvořenému alfa-MEM s 10% lidským sérem nepřineslo zvláštní zlepšení. Zaznamenali jsme dva průlomové: při přidání dalších dvou růstových faktorů, FGF-2 a M-CSF (**Tsutsumi S, 2001; Jing-Xiang F, 2004**), a zejména při záměně alfa-MEM za CellGro™ for Hematopoietic Cells (CellGenix, Freiburg, Německo). Výsledky těchto experimentů byly zveřejněny v publikaci **Pytlík R, 2009**.

V krátkosti, po dvoutýdenní kultivaci dřevňových mononukleárních buněk v koncentraci  $2.5 \times 10^6$ /ml v  $75 \text{ cm}^2$  kultivačních lahvích TPP (Transadigen, Švýcarsko) jsme v médiu CellGro™ for Hematopoietic Cells doplněné 10% fetálním telecím sérem a suplementovaném askorbátem, dexamethasonem, inzulinem, EGF, PDGF-BB, FGF-2 (též bFGF) a M-CSF (dále CellGro™ + LS + S) za okolností, kdy nebylo médium po celou dobu experimentu vyměněno a pouze byly 2x týdně přidávány suplementy, dosahovali mediánu výtěžků  $2.87 \times 10^6$  MSC na  $10^6$  nasazených BMMC (rozmezí,  $4.4 \times 10^5$ - $7.18 \times 10^6$ ). V alfa-MEM s fetálním telecím sérem bez suplementů byl sklizen medián  $9,8 \times 10^4$  MSC na  $10^6$  BMMC (rozmezí,  $2 \times 10^4$ - $2.4 \times 10^5$ ). Graficky je toto znázorněno na **Obr. 17**.

**Obr. 16 - spontánní adipogenní diferenciaci hMSC v alfa-MEM s 10% lidským sérem. Nepublikovaný obrázek.**

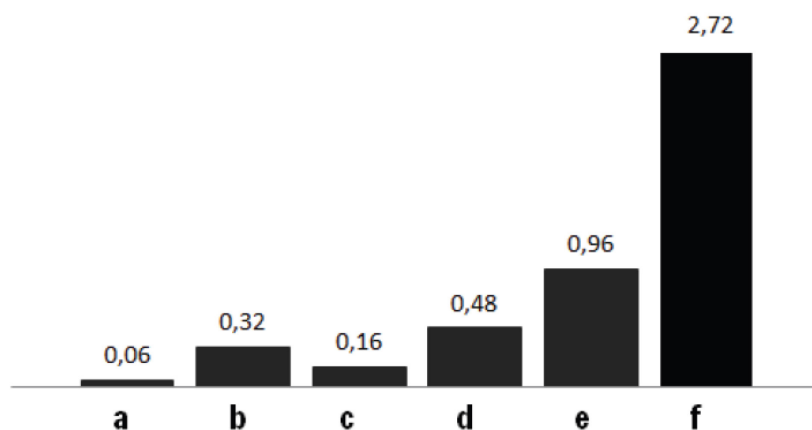




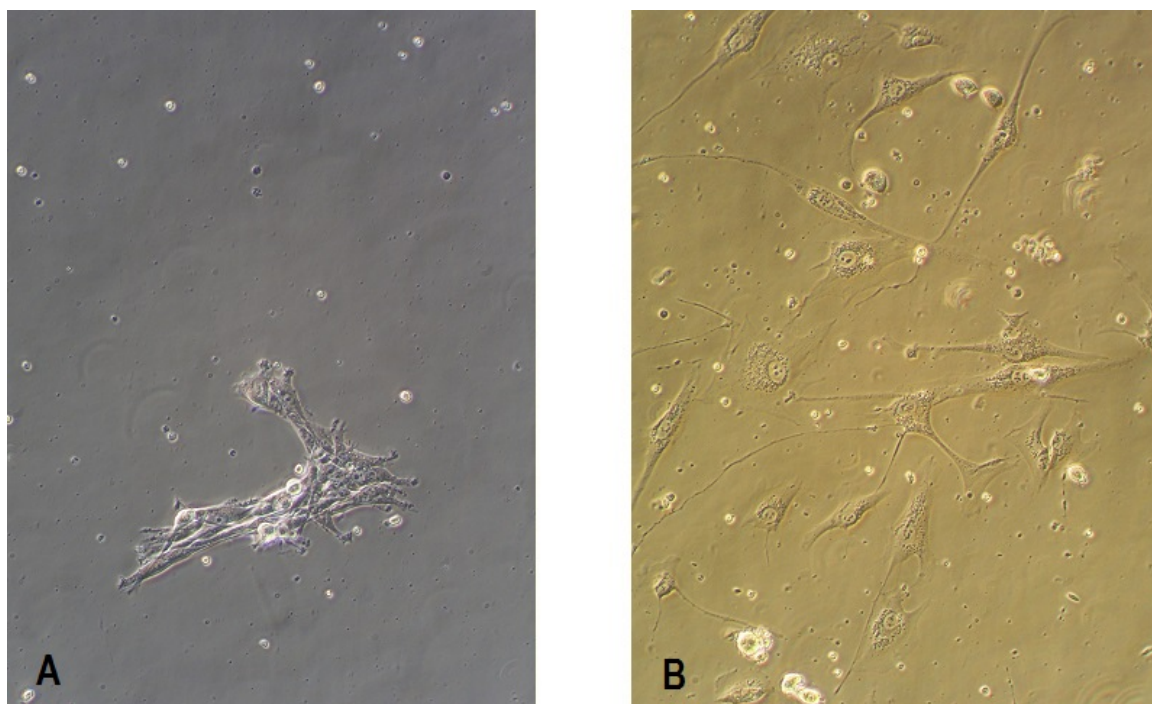
Vzhledově se buňky i kultury vypěstované novým způsobem v CellGro™ s LS a S od hMSC kultivovaných v alfa-MEM s FCS výrazně odlišovaly. Na **Obr. 18A** je vidět, že v počátečních fázích tvorby shluků a kolonií jsou hMSC k sobě poměrně těsně nahloučeny (srovnej s **Obr. 3A, B**). Buňky kultivované v CellGro™ + LS + S jsou rovněž protáhlejší a více granulované (**Obr. 18B**). V dalším růstu pak nedocházelo k tvorbě jednovrstevných kolonií, jako u v CellGro™ s lidským sérem a suplementy, ale buňky se vzájemně překrývají a tvoří i mnohavrstevné kolonie, které jsou proti světlu v kultivační nádobce patrné i pouhým okem (**Obr. 19A, B**, srovnej s **Obr. 3C**). Vzhledem k použití lidského séra jsme v některých kulturách pozorovali sklon ke spontánní adipogenní diferenciaci, zejména pokud bylo vynecháno PDGF-BB (viz další odstavec, **Obr. 19 C, D**).

Cílem další práce bylo zjistit, které suplementy jsou pro buňky kultivované v CellGro™ s lidským sérem opravdu nezbytné. V jednotlivých experimentech byly postupně jednotlivé suplementy vysazovány, a to tak, že nejprve byl vynechán jeden suplement, pak kombinace dvou a čtyř suplementů, pak pět suplementů (kromě askorbátu a dexamethasonu, viz dále). Koloniformní schopnosti a celkové výtěžky byly porovnány s kompletním médiem se všemi sedmi suplementy. Výsledky těchto pokusů byly zveřejněny v publikaci **Stehlík D, 2012**.

**Obr. 17 - Pytlík R, 2011. Srovnání výtěžků MSC z různých médií. a - alfa-MEM + FCS, b - alfa-MEM + LS, c- alfa-MEM + LS + pět Gronthos-Simmonsových suplementů (askorbát, dexamethason, inzulin, EGF, PDGF-BB), d - alfa-MEM + LS + 5 Gronthos-Simmonsových suplementů + FGF-2, e - alfa-MEM + LS + 5 Gronthos-Simmonsových suplementů + FGF-2 + M-CSF, f - CellGro™ + LS + 5 Gronthos-Simmonsových suplementů + FGF-2 + M-CSF. Výtěžky buněk jsou uvedeny jako počty MSCx10<sup>6</sup> na 10<sup>6</sup> nasazených mononukleárních buněk z kostní dřeni.**



**Obr. 18 - úvodní expanze hMSC v CellGro™ + LS + S. A - den 10 buněčné kultury, B - den 12 buněčné kultury. Zvětšení 200x. Nepublikované obrázky.**



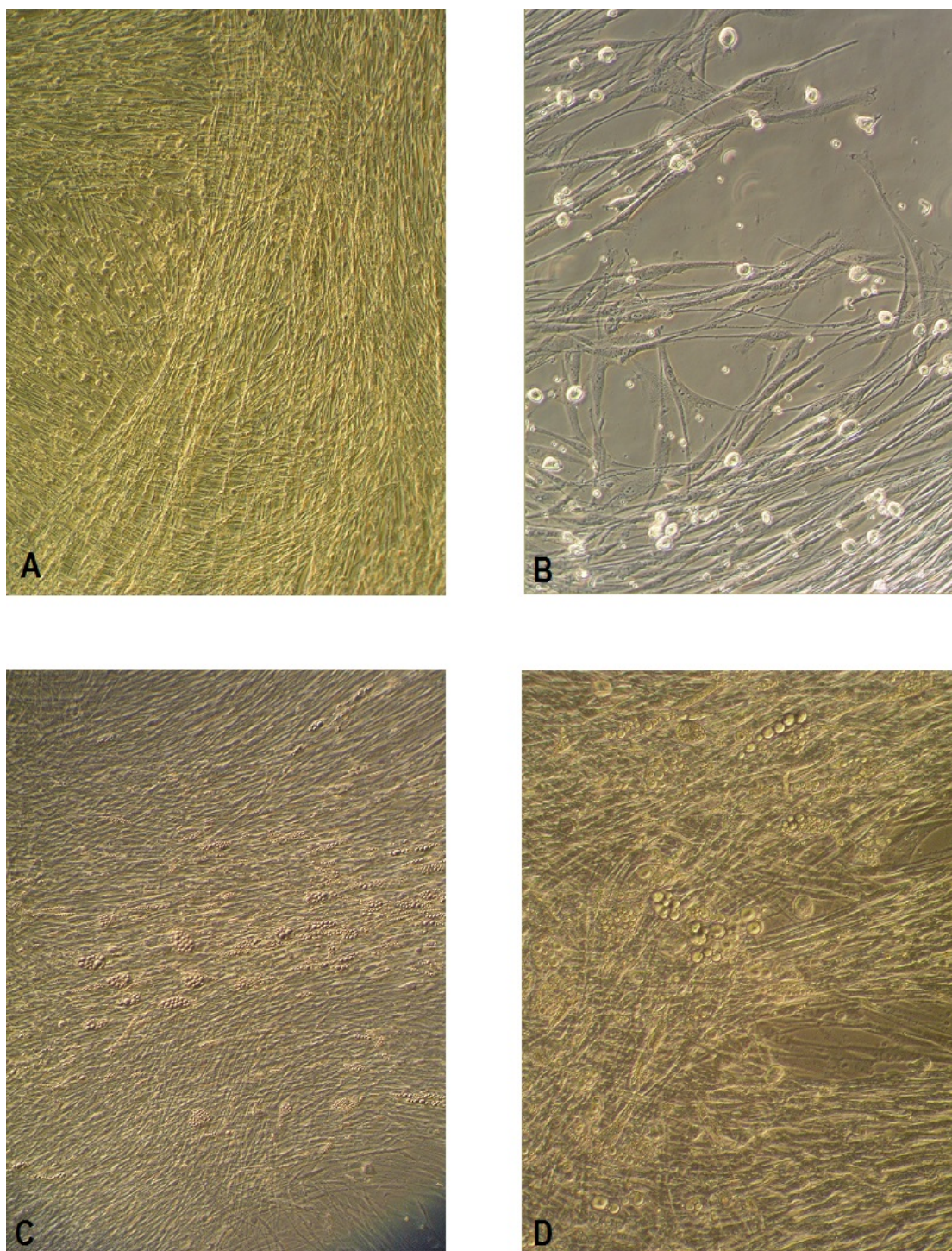
Již při vysazování jednoho suplementu jsme zjistili, že kyselina askorbová a dexamethason jsou při kultivaci buněk v CellGro™ s lidským sérem naprosto nezbytné, takže při vynechávání dvou suplementů jsme vždy ponechali dexamethason a při vynechávání dvou suplementů jsme vždy ponechali jak askorbát, tak dexamethason. Výsledky ukázaly, že je možné bezpečně vysadit M-CSF bez snížení výtěžku hMSC, i když došlo k jistému snížení koloniformní kapacity. Celkový přehled výsledků těchto prací je uveden v **Tab. 6 a 7**.

Dále jsme se pokusili přenést náš kultivační postup do lahví RoboFlask™ (Corning, Acton, Massachusetts, US), což jsou láhve s víčkem z měkké pryže, které je možno opakovaně propíchnout sterilní jehlou, a odvětrávacím filtrem pro výměnu plynů (**Obr. 10 a 20**).

Nádobky RoboFlask™ se užívají při automatizované kultivaci. Techniku přidávání suplementů a sběru hMSC bez otevření víčka se nám podařilo zvládnout a hMSC v této lahvi rostly dobře, i když poněkud hůře než v plastu TPP (cca o 20% horší výtěžky). Tímto způsobem (i když jsme veškeré manipulace prováděli mechanicky) jsme prokázali, že náš způsob kultivace hMSC je vhodný i do automatizovaných provozů. Výsledky kultivace v lahvích RoboFlask™ v porovnání s kultivačním plastem TPP jsou uvedeny v **Tab. 8**.



Obr. 19. Lidské MSC kultivované v CellGro™ + LS + S. A - den 12, vícevrstevný růst, 100x. B - den 12, okraj kolonie, 200x. C - spontánní adipogenní diferenciace, 100x. C - spontánní adipogenní diferenciace, 200x. Nepublikované obrázky.



K ochraně námi vyvinutého způsobu kultivace hMSC jsem spolu s dalšími spolupracovníky (jmenovitě, Hofman Petr, Ing. PhD, Trč Tomáš, Doc. MUDr. CSc., Stehlík David, MUDr. Soukup Tomáš, MUDr., Klener Pavel Prof. MUDr. DrSc. za Univerzitu Karlovu v Praze, Kobylka Petr, MUDr. CSc. za Ústav hematologie a krevní transfuse, Praha, a Rypáček František RNDr. CSc. spolu s Mulínkovu

Katarinou, Ing. za Ústav makromolekulární chemie AV ČR., v.v.i., Praha) podali v lednu roku 2006 patentovou přihlášku o český patent pod číslem PV 2009-49. Patent byl udělen pod číslem 301 148 v říjnu 2009 a oznámení o udělení vyšlo ve Věstníku Úřadu průmyslového vlastnictví č. 46/2009 v listopadu 2009. Majiteli patentu se stala Univerzita Karlova v Praze, Ústav hematologie a krevní transfuse Praha a Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Praha. Univerzita Karlova v Praze byla následně pověřena správcovstvím oběma dalšími institucemi. Souběžně byla v lednu 2007 vyplněna evropská patentová přihláška k Mezinárodnímu registru pro patenty a ochranné známky (International Patent and Trademark Register, referenční číslo EP 07702321), která byla zveřejněna v prosinci 2008 pod číslem EP 1999250. V červenci 2011 byl evropský patent pod tímto číslem udělen.

V patentových přihláškách byly kromě kultivačního postupu též zveřejněny doklady o tom, že námi kultivované buňky splňují kritéria MSC (**Dominici M, 2006**), včetně dokladů o jejich schopnosti multilineární diferenciaci (viz následující oddíl). Dále v něm byl též náčrt jednoduchého kultivačního zařízení, využívajícího láhve RoboFlask™, ale manipulovaného manuálně. O patent byl následně zájem ze strany několika investorů, ovšem z multifaktoriálních důvodů bohužel k dohodě s žádným z nich nedošlo. V roce 2016 přestala Univerzita Karlova v Praze platit patentové poplatky, v důsledku čehož patent vypršel. I přesto pokládám za účelné na patent poukázat, protože šlo o výsledek několikaleté práce a též o doklad uznání originality námi vyvinutého způsobu kultivace hMSC.

**Obr. 20 - kultivační láhev RoboFlask™ (Corning, Acton, Massachusetts, US).**



**Tab. 6 – Stehlík D, 2012. Koloniformní kapacita hMSC pěstovaných v CellGro™ s lidským telecím sérem a jednotlivými suplementy. CM = kompletní médium, ins = inzulin, počet kolonií na 10<sup>6</sup> nasazených BMMC.**

Kombinace suplementů	Průměr ± směrodatná odchylka)	p (ve srovnání s CM)
<b>Vynechání jednoho suplementu</b>		
Kompletní médium (CM)	33.4 ± 12.2	-
CM – askorbát	15.9 ± 9.9	<b>0.0008</b>
CM – dexamethason	9.1 ± 5.2	<b>0.0006</b>
CM – ins	29.5 ± 10.3	0.19
CM – EGF	29.5 ± 12.1	0.13
CM – FGF2	21.8 ± 7.8	<b>0.003</b>
CM – M-CSF	25.9 ± 11.7	<b>0.03</b>
CM – PDGF-BB	25.2 ± 8.8	<b>0.01</b>
<b>Vynechání dvou suplementů</b>		
Kompletní médium (CM)	41.6 ± 20.6	-
CM – askorbát – inzulin	26.0 ± 25.0	<b>0.004</b>
CM – askorbát – EGF	23.8 ± 24.4	<b>0.046</b>
CM – askorbát – FGF2	16.6 ± 22.8	<b>0.01</b>
CM – askorbát – M-CSF	21.3 ± 20.1	<b>0.012</b>
CM – askorbát – PDGF-BB	18.1 ± 9.5	<b>0.041</b>
CM – ins – EGF	39.1 ± 21.3	0.4
CM – ins – FGF2	36.3 ± 26.3	0.24
CM – ins – M-CSF	43.5 ± 26.8	0.67
CM – ins – PDGF-BB	34.4 ± 19.3	0.17
CM – EGF – FGF2	47.2 ± 42.3	0.66
CM – EGF – M-CSF	43.2 ± 21.3	0.71
CM – EGF – PDGF-BB	35.6 ± 17.5	0.21
CM – FGF2 – M-CSF	33.5 ± 30.6	0.23
CM – FGF2 – PDGF-BB	35.3 ± 39	0.6
CM – M-CSF – PDGF-BB	45.0 ± 32.9	0.77
<b>Vynechání čtyř suplementů</b>		
Kompletní médium (CM)	30.1 ± 23.6	-
CM – ins – EGF – FGF-2 – M-CSF	25.8 ± 23.5	<b>0.0005</b>
CM – ins – EGF – FGF-2 – PDGF-BB	13.8 ± 16.2	<b>0.0035</b>
CM – ins – EGF – M-CSF – PDGF-BB	22.7 ± 16.2	0.08
CM – ins – FGF-2 – M-CSF – PDGF-BB	23.0 ± 20.9	<b>0.002</b>
<b>Vynechání pěti suplementů</b>		
Kompletní médium (CM)	30.1 ± 23.6	-
Ponechán pouze askorbát a dexamethason	15.0 ± 16.4	<b>0.001</b>

**Tab. 7 – Stehlík D, 2012. Výtěžky hMSC pěstovaných v CellGro™ s lidským sérem a jednotlivými suplementy. CM = kompletní médium, ins = inzulin, počet sklizených buněk na 10<sup>6</sup> nasazených BMMC.**

Kombinace suplementů	Průměr ± směrodatná odchylka)	p (ve srovnání s CM)
<b>Vynechání jednoho suplementu</b>		
CM	2.3 ± 1.7 x10 <sup>6</sup>	-
CM – askorbát	1.0 ± 1.0 x10 <sup>6</sup>	<b>0.02</b>
CM – dexamethason	0.4 ± 0.1 x10 <sup>6</sup>	<b>0.02</b>
CM – ins	2.3 ± 1.4 x10 <sup>6</sup>	0.75
CM – EGF	2.1 ± 1.3 x10 <sup>6</sup>	0.41
CM – FGF2	1.1 ± 0.7 x10 <sup>6</sup>	<b>0.03</b>
CM – M-CSF	2.3 ± 1.5 x10 <sup>6</sup>	0.9
CM – PDGF-BB	0.9 ± 0.6 x10 <sup>6</sup>	<b>0.048</b>
<b>Vynechání dvou suplementů</b>		
CM	4.1 ± 3.8 x10 <sup>6</sup>	-
CM – askorbát – inzulin	1.9 ± 2.7 x10 <sup>6</sup>	<b>0.036</b>
CM – askorbát – EGF	1.7 ± 1.9 x10 <sup>6</sup>	0.095
CM – askorbát – FGF2	0.8 ± 1.1 x10 <sup>6</sup>	0.093
CM – askorbát – M-CSF	1.5 ± 2.1 x10 <sup>6</sup>	0.056
CM – askorbát – PDGF-BB	0.9 ± 0.8 x10 <sup>6</sup>	0.12
CM – ins – EGF	4.3 ± 2.7 x10 <sup>6</sup>	0.82
CM – ins – FGF2	3.0 ± 2.8 x10 <sup>6</sup>	0.16
CM – ins – M-CSF	3.9 ± 3.6 x10 <sup>6</sup>	0.84
CM – ins – PDGF-BB	2.0 ± 1.8 x10 <sup>6</sup>	0.14
CM – EGF – FGF2	2.2 ± 2.4 x10 <sup>6</sup>	0.084
CM – EGF – M-CSF	3.8 ± 3.2 x10 <sup>6</sup>	0.71
CM – EGF – PDGF-BB	1.2 ± 0.9 x10 <sup>6</sup>	0.147
CM – FGF2 – M-CSF	2.4 ± 2.8 x10 <sup>6</sup>	<b>0.049</b>
CM – FGF2 – PDGF-BB	0.8 ± 0.7 x10 <sup>6</sup>	0.13
CM – M-CSF – PDGF-BB	2.0 ± 2.1 x10 <sup>6</sup>	0.099
<b>Vynechání čtyř suplementů</b>		
CM	2.9 ± 2.4 x10 <sup>6</sup>	-
CM – ins – EGF – FGF-2 – M-CSF	1.7 ± 1.8 x10 <sup>6</sup>	<b>0.044</b>
CM – ins – EGF – FGF-2 – PDGF-BB	0.4 ± 0.4 x10 <sup>6</sup>	<b>0.011</b>
CM – ins – EGF – M-CSF – PDGF-BB	1.2 ± 1.2 x10 <sup>6</sup>	<b>0.011</b>
CM – ins – FGF-2 – M-CSF – PDGF-BB	0.6 ± 0.4 x10 <sup>6</sup>	<b>0.011</b>
<b>Vynechání pěti suplementů</b>		
CM	2.9 ± 2.4 x10 <sup>6</sup>	-
Ponechán pouze askorbát a dexamethason	0.3 ± 0.2 x10 <sup>6</sup>	<b>0.001</b>

**Tab. 8 – Stehlík D, 2012. Porovnání efektivity kultivací hMSC v CellGro™ + lidské telecí sérum + suplementy v standardní v. automatizovatelné plastové nádobce. Výsledky udány jako průměr ± směrodatná odchylka.**

	Plast TPP	RoboFlask™	P
Počet adherentních buněk	1.55 ± 0.72 x10 <sup>6</sup>	1.23 ± 0.64 x10 <sup>6</sup>	<b>0.0027</b>
% CD45negCD235aneg buněk v produktu	92.2 ± 4.7%	93.2 ± 5.7%	0.37
Počet hMSC	1.44 ± 0.69 x10 <sup>6</sup>	1.14 ± 0.61 x10 <sup>6</sup>	<b>0.004</b>



## 5.2.3. Vlastnosti hMSC kultivovaných novou metodikou

### 5.2.3.1. Trilineární diferenciaci

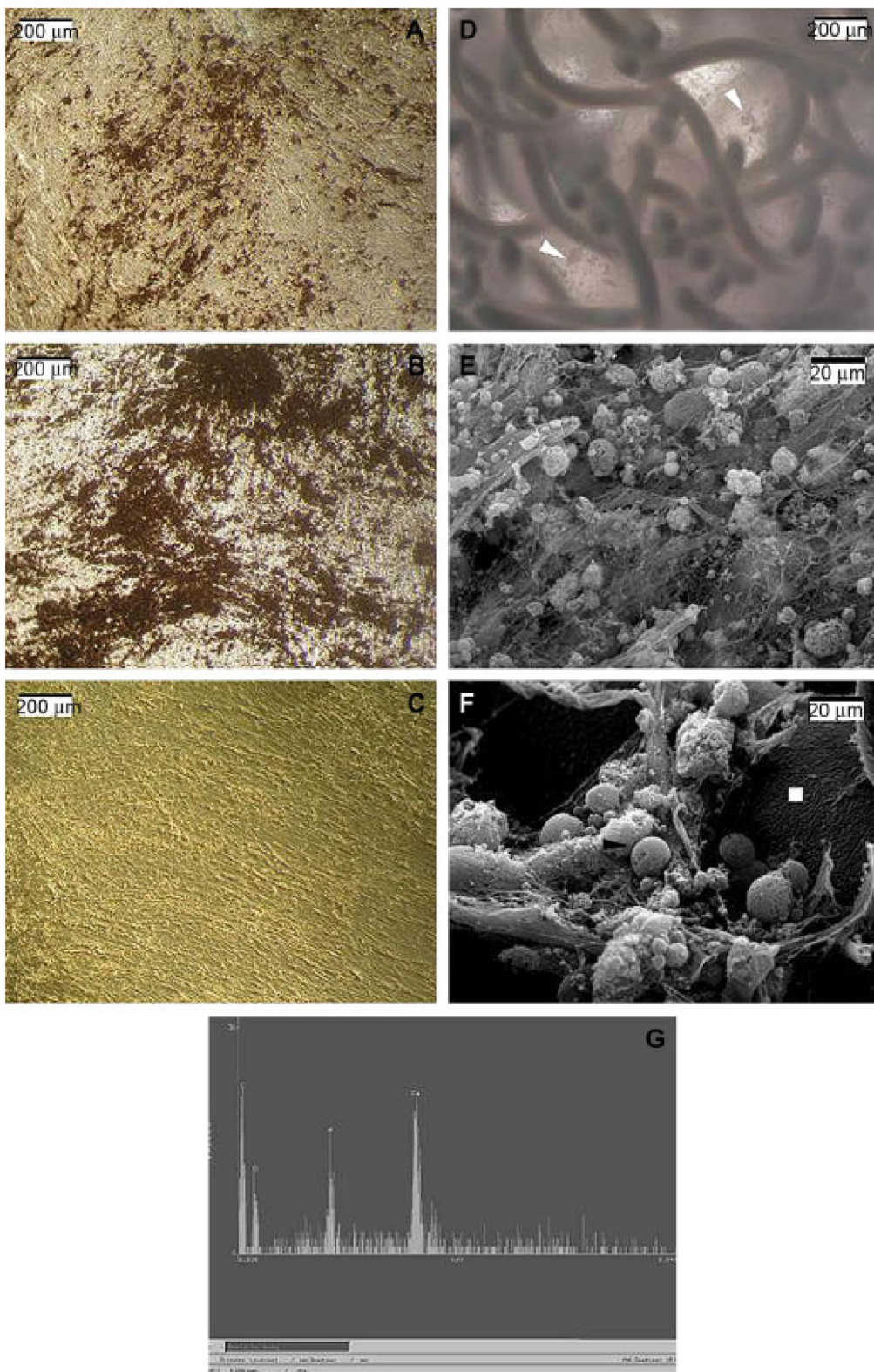
Doklady o schopnosti trilineární diferenciaci hMSC vypěstovaných v CellGro™ s lidským sérem a suplementy *in vitro* byly zveřejněny v publikacích **Pytlík R, 2009** a **Stehlík D, 2012**, stejně jako ve výše uvedených patentech - českém (301 148) a evropském (EP 1 999 250).

V práci **Pytlík R, 2009** jsou uvedeny cytochemické, histochemické a imunohistochemické doklady trilineárních diferenciacních schopností buněk kultivovaných v CellGro™ + LS + S *in vitro*. Dále jsou zde uvedeny doklady o tom, že takto připravené hMSC jsou schopné růstu na polylaktidových scaffoldech, kde se diferencují *in vitro* v osteoblasty, a dále schopnost takto osazených a prediferencovaných buněk na scaffoldech vytvářet kalcifikované struktury *in vivo*.

**Osteogenní diferenciaci.** Lidské MSC vypěstované v CellGro™ + LS + S po diferenciaci v osteogenním médiu tvořily ve 2D systému (na kultivačních destičkách) noduly, které se barvily von Kossovým barvením a barvením na alkalickou fosfatázu. Von Kossovo barvení bylo výrazně silnější, pokud byl jako základ diferenciacního média použito CellGro™ s lidským sérem bez suplementů (**Obr. 21 A, B, Obr. 21 C** je negativní kontrola), i když kvantitativní měření nebyla provedena z technických důvodů. Po nasazení na 3D polylaktidové scaffoldy do média alfa-MEM s FCS buňky dále proliferovaly (**Obr. 23D**). Pokud byly scaffoldy diferencovány v osteogenním médiu, byla rastrovací elektronovou mikroskopií patrná akumulace kalciových solí a tvorba vazivových vláken (**Obr. 23E, F**). Elementární analýza oblastí bohatých na mikrokrystaly pak ukázala, že tyto krystaly mají poměr kalcium-fosfor 5:3, což je typické pro hydroxyapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , **Obr. 23G**). Při imunohistochemickém vyšetření byla patrná pozitivita na osteokalcin.

V dalších experimentech byly polylaktidové scaffoldy s hMSC prediferencovány v osteogenním médiu po dobu 2-4 týdnů a implantovány podkožně do modelu NOD/LtSz-Rag1<sup>null</sup> myší (**Obr. 22**). Scaffoldy osazené buňkami vypěstovanými v CellGro™ s lidským sérem a suplementy byly srovnávány se scaffoldy osazenými buňkami vypěstovanými v alfa-MEM s fetálním telecím sérem a s prázdnými scaffoldy. Po šesti týdnech *in vivo* se na scaffoldech osazených buňkami vypěstovanými v CellGro™ s fetálním telecím sérem vytvořila vazivová tkáň, barvící se modře při použití Ladewigovy modifikace Massonova modrého trichromu, s dobře patrnými lidskými buňkami (**Obr. 23A**). Po devíti týdnech byla již tkáň mineralizovaná, červeně se barvící výše uvedenou metodou (**Obr. 23B, C**). Při barvení Massonovým zeleným trichromem se dobře zbarvují paralelně orientovaná kolagenní vlákna. V těchto řezech jsou patrné dva druhy buněk: malé mononukleární buňky (dlouhé šipky) a velké vícejaderné buňky (velká krátká šipka na **Obr. 23D**). Zatímco malé buňky mohou odpovídat lidským MSC (imunohistochemická barvení na průkaz lidských buněk však provedena nebyla), velké buňky jsou nejpravděpodobněji myší

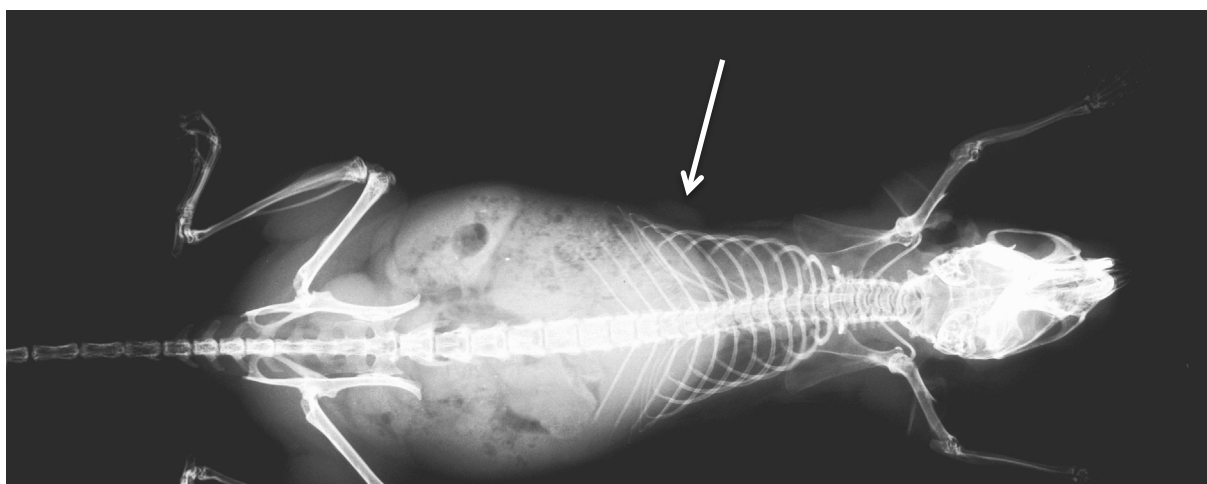
Obr. 21 - Pytlík *et al*, 2009. Diferenciace hMSC do osteogenní linie. A - hMSC kultivované v alfa-MEM + FCS, von Kossa, B - hMSC kultivované v CellGro™ + LS + S, von Kossa, C - negativní kontrola, von Kossa, D - diferenciace hMSC kultivovaných v CellGro™ + LS + S na polyaktidových scaffoldech s ukládáním minerálu (bílé šipky), E, F - elektronmikroskopické snímky téhož, G - elektronově mikroskopická prvková analýza.





buňky z cizích tělísek jako reakce na polylaktid. Na **Obr. 23E** je dobře vidět, že při osazení scaffoldů hMSC vykultivovanými v alfa-MEM s fetálním telecím sérem je tvorba kolagenu podstatně slabší. **Obr. 23F** představuje negativní kontrolu (prázdný polylaktid).

**Obr. 22** - rentgenový snímek NOD/LtSzRagnull/null myši s implantovaným částečně mineralizovaným scaffoldem s hMSC kultivovaných v CellGro™ s lidským sérem a suplementy (9 týdnů) - vyznačeno šipkou. Kontrolní scaffold (bez buněk) na druhé straně hrudníku není patrný. Nepublikovaný obrázek.

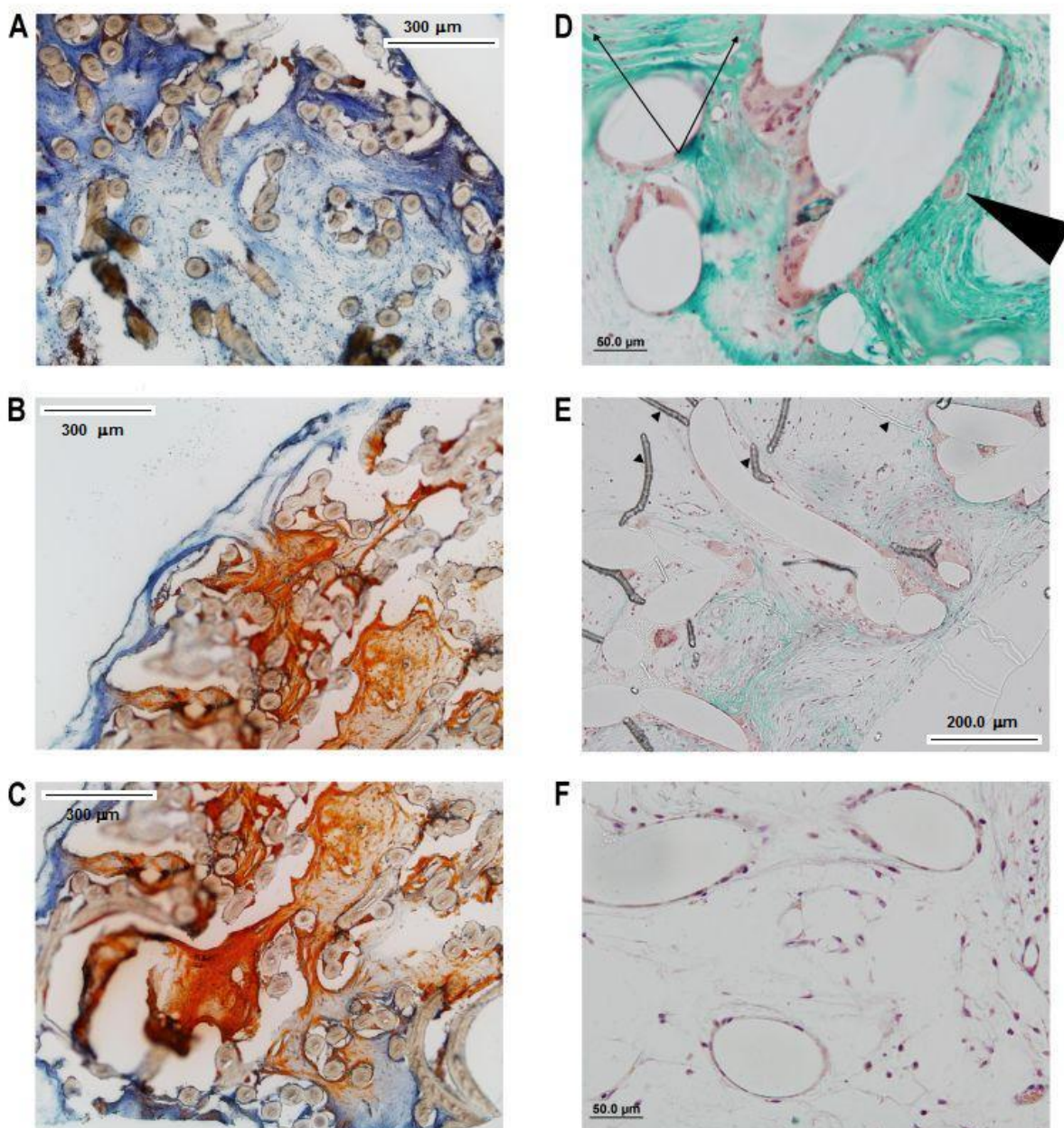


V dalších experimentech jsme sledovali expresi povrchových znaků, jmenovitě BMP-2 a BMP-7 na povrchu hMSC v průběhu kultivace v CellGro™ s lidským sérem a suplementy a v alfaMEM s fetálním telecím sérem. Expresie jsme sledovali jednak v osteokalcin negativní frakci (tj. buňky schopné další proliferace), tak v osteokalcin pozitivní frakci (terminálně diferencované buňky). Výsledky jsou uvedeny v **Tab. 9**.

V obou frakcích (osteokalcin<sup>+</sup> i osteokalcin<sup>-</sup>) byla vyšší exprese BMP2 na buňkách kultivovaných v CellGro™ + LS + S, přičemž statisticky významnější byl rozdíl v osteokalcin<sup>-</sup> frakci. Expresie BMP-7 nebyla statisticky signifikantně odlišná u buněk kultivovaných různým způsobem, a to ani v osteokalcin<sup>+</sup>, ani v osteokalcin<sup>-</sup> frakci.

Co se týče diferenciaci do dalších dvou linií, tak schopnost **adipogenní diferenciaci hMSC** pocházejících z CellGro™ s LS + S byla prokázána jejich kultivací ve 2D (na tkáňových miskách) v adipogenním indukčním a udržovacím médiu a barvením tukových kapének olejovou červení. **Chondrogenní diferenciaci** pak kultivací hMSC v mikropelletách v kónických zkumavkách v chondrogenním médiu založeném na CellGro™ (při použití alfa-MEM buňky netvořily pelety) a barvením na alcianovou modř a protilátky proti kolagenu II (**Obr. 24**).

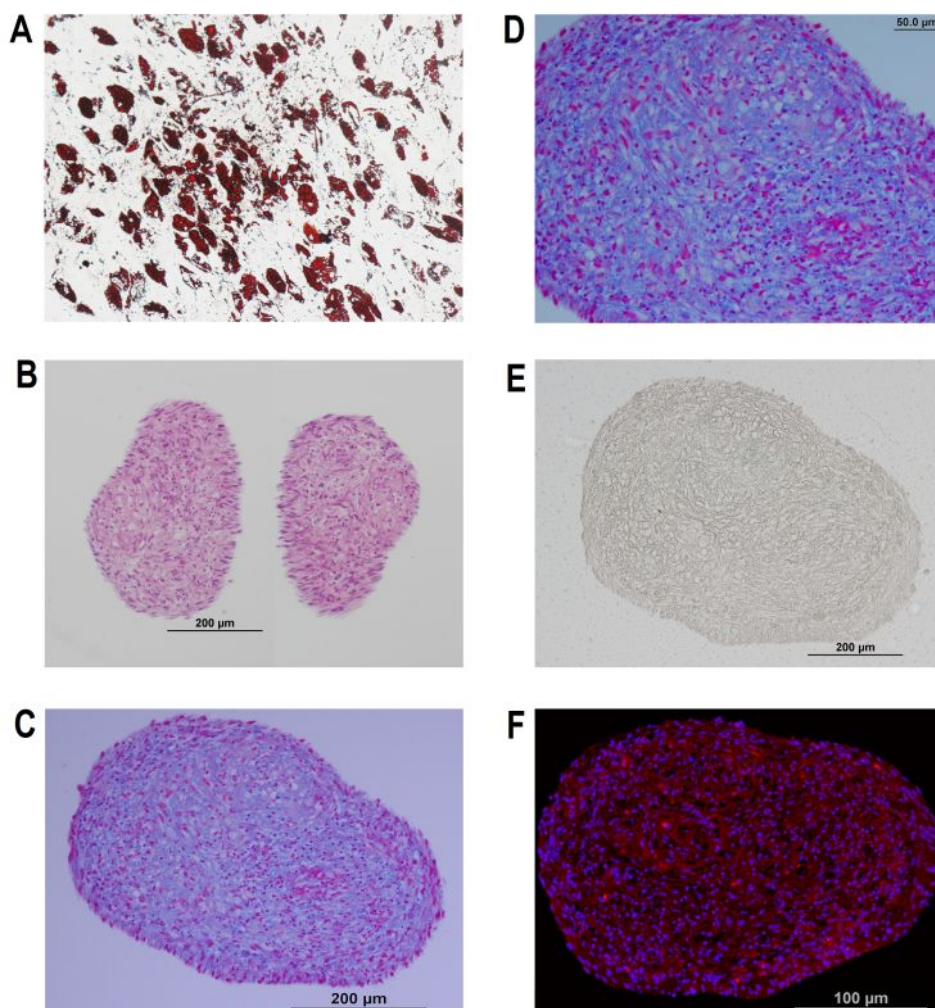
Obr. 23 - Pytlík R, 2009. Polylaktidové scaffoldy osazené hMSC a implantované subkutánně do NOD/LtSz-Rag1<sup>null/null</sup> myši. A: hMSCs získané kultivací v CellGro™ + LS + S, Ladewigova modifikace Massonova modrého trichromu, scaffold vyjmut po šesti týdnech. Neminerální matrix se barví modře. B a C: hMSCs získané kultivací v CellGro™ + LS + S, Ladewigova modifikace Massonova modrého trichromu, scaffold vyjmut po devíti týdnech. Neminerální matrix se barví modře, kalcifikované oblasti oranžovočerveně. Na obr. B je patrné přemostování polyaktidových vláken a lamelární struktura některých kalcifikovaných oblastí. D. hMSCs získané kultivací v CellGro™ + LS + S, Massonův zelený trichrom, scaffold vyjmut po devíti týdnech. Kolagenní vlákna se barví zeleně, buňky hnědě. Dlouhé šipky ukazují na malé mononukleární buňky, krátká velká šipka na obrovskou multijadernou buňku z cizích těles. E: hMSC získané kultivací v alfaMEM s FCS, Massonův zelený trichrom, scaffold vyjmut po devíti týdnech. Kolagenní vlákna jsou mnohem řidší a hůře organizovaná. Šipky ukazují na artefakty vzniklé při přípravě preparátu. F: kontrolní scaffold bez hMSC, Massonův zelený trichrom.



Tab. 9 – Stehlík D, 2012. Expresse BMP2 a 7 u hMSC kultivovaných v alfaMEM s FCS a u hMSC kultivovaných v CellGro™ + LS + S.

Expresse BMP2			
	AlfaMEM + FCS	CellGro™+LS+S	P =
Osteokalcin-	7.5 ± 8 %	28.7 ± 6.3 %	<b>0.0039</b>
Osteokalcin+	3.6 ± 1.5%	22.6 ± 18.9 %	0.055
Expresse BMP7			
	AlfaMEM + FCS	CellGro™+LS+S	P =
Osteokalcin-	9.0 ± 8.7 %	4.3 ± 5.4 %	0.37
Osteokalcin+	6.3 ± 4.1 %	6.2 ± 7.7 %	0.97

Obr. 24 - Pytlík R, 2009. Adipogenní a chondrogenní diferenciacie hMSC vypěstovaných v CellGro™ s lidským sérem a suplementy. A: adipogenní diferenciacie na kultivačních destičkách, barvení olejovou červení po třech týdnech. B-F: chondrogenní diferenciacie v mikropeletě po dvou týdnech kultivace. B: barvení hematoxylin-eozin, C, D: alcianová modř, E: imunohistochemie na kolagen II, F: imunofluorescenční barvení na kolagen II: kolagen, Cy3 (červeně), chondroblastická jádra dobarvena DAPI (modře).



### 5.2.3.2. Povrchové znaky

Srovnání povrchových znaků buněk pěstovaných v CellGro™+LS+S s buňkami pěstovanými v alfa-MEM s FCS je popsáno v publikaci **Pytlík et al, 2009** a je uvedeno v **Tab. 10**. Zkoumáno bylo celkem 19 antigenů, z toho deset tvořily adhezivní molekuly na povrchu hMSC, tři byly proliferační či diferenciační markery a šest znaků představovalo markery krvetvorných buněk.

Co se týče exprese adhezivních molekul, hMSC expandované v CellGro™ s LS a S měly signifikantně vyšší expresi beta-1 integrinu CD29, receptoru pro hyaluronovou kyselinu CD44, alfa3 a alfa4 integrinu CD49c a CD49d a VCAM-1 (adhezivní molekula vaskulárních buněk, CD106) než buňky pěstované v alfa-MEM + FCS. U buněk kultivovaných v CellGro™ s LS a S byla signifikantně zvýšená exprese proliferačního markeru CD71 (transferinový receptor). Co se týče hematopoetických markerů, jejich exprese je vyšší než je běžně uváděno, ale paradoxně nižší u buněk pěstovaných v CellGro™ + LS + S, kde se neadherentní buňky neodmývaly. Buňky kultivované v alfa-MEM s FCS měly nesignifikantně vyšší expresi CD105.

**Tab. 9 - upraveno z Pytlík R, 2009. Srovnání exprese povrchových znaků na hMSC kultivovaných v různých médiích. Tučně zvýrazněné výsledky jsou statisticky signifikantně rozdílné (p <0.05). Výsledky jsou uvedeny jako mediány a rozmezí.**

<b>Povrchové adhezivní molekuly</b>		
	alfa-MEM + FCS	CellGro™ + LS + S
CD29	<b>77.6% (19.3 - 92.2%)</b>	<b>95% (92.9 - 99.6%)</b>
CD44	<b>52.2% (16.9 - 76.5%)</b>	<b>90.8% (35.9 - 95.3%)</b>
CD49a	14.2% (0.4 - 36.9%)	13.6% (1 - 46.5%)
CD49c	<b>6.3% (1.3 - 19.3%)</b>	<b>34.7% (28.8 - 41.2%)</b>
CD49d	<b>9.3% (3.2 - 42.3%)</b>	<b>30.2% (21-61.9%)</b>
CD49e	15.1% (4.5 - 33%)	25.8% (13.3 - 50.2%)
CD63	55.6% (10.7-83.1%)	64.2% (49-89.9%)
CD90	58.1% (24.7 - 67.9%)	65% (15 - 83%)
CD105	44.2 (2.4 - 69.7%)	25.5% (18.6 - 59.7%)
CD106	<b>3.7% (0.7 - 73.3%)</b>	<b>13% (9.8 - 47.2%)</b>

<b>Markery proliferace a diferenciace</b>		
	Alfa-MEM + FCS	CellGro™ + LS + S
CD71	<b>21.6% (15.9 - 79%)</b>	<b>47.4% (29.9 - 63.3%)</b>
CD166	50.9% (3.5 - 88.1%)	31% (3 - 43.3%)
alkalická fosfatáza	15.1% (4.5 - 83.7%)	14.2% (9.9 - 23.1%)

<b>Hematopoetické markery</b>		
	Alfa-MEM + FCS	CellGro™ + LS + S
CD11c	<b>22.2% (9.5 - 46.8%)</b>	<b>10.2% (1.3 - 22.1%)</b>
CD14	6% (0.3 - 9.9%)	1.6% (0.8 - 4.6%)
CD18	<b>6.1% (0.1 - 11.1%)</b>	<b>0.2% (0.1 - 0.8%)</b>
CD34	<b>0.5% (0. - 2.1%)</b>	<b>0.1 (0 - 0.5%)</b>



CD45	15.2% (7.8 - 26.5%)	8.8% (4.1 - 40.6%)
CD68	7.6% (3.5 - 14.7%)	7.8% (3.5 - 11.8%)

### Povrchové adhezní molekuly

	alfa-MEM + FCS	CellGro™ + LS + S
CD29	<b>77.6% (19.3 - 92.2%)</b>	<b>95% (92.9 - 99.6%)</b>
CD44	<b>52.2% (16.9 - 76.5%)</b>	<b>90.8% (35.9 - 95.3%)</b>
CD49a	14.2% (0.4 - 36.9%)	13.6% (1 - 46.5%)
CD49c	<b>6.3% (1.3 - 19.3%)</b>	<b>34.7% (28.8 - 41.2%)</b>
CD49d	<b>9.3% (3.2 - 42.3%)</b>	<b>30.2% (21-61.9%)</b>
CD49e	15.1% (4.5 - 33%)	25.8% (13.3 - 50.2%)
CD63	55.6% (10.7-83.1%)	64.2% (49-89.9%)
CD90	58.1% (24.7 - 67.9%)	65% (15 - 83%)
CD105	44.2 (2.4 - 69.7%)	25.5% (18.6 - 59.7%)
CD106	<b>3.7% (0.7 - 73.3%)</b>	<b>13% (9.8 - 47.2%)</b>

### Markery proliferace a diferenciac

	Alfa-MEM + FCS	CellGro™ + LS + S
CD71	<b>21.6% (15.9 - 79%)</b>	<b>47.4% (29.9 - 63.3%)</b>
CD166	50.9% (3.5 - 88.1%)	31% (3 - 43.3%)
alkalická fosfatáza	15.1% (4.5 - 83.7%)	14.2% (9.9 - 23.1%)

### Hematopoetické markery

	Alfa-MEM + FCS	CellGro™ + LS + S
CD11c	<b>22.2% (9.5 - 46.8%)</b>	<b>10.2% (1.3 - 22.1%)</b>
CD14	6% (0.3 - 9.9%)	1.6% (0.8 - 4.6%)
CD18	<b>6.1% (0.1 - 11.1%)</b>	<b>0.2% (0.1 - 0.8%)</b>
CD34	<b>0.5% (0. - 2.1%)</b>	<b>0.1 (0 - 0.5%)</b>
CD45	15.2% (7.8 - 26.5%)	8.8% (4.1 - 40.6%)
CD68	7.6% (3.5 - 14.7%)	7.8% (3.5 - 11.8%)

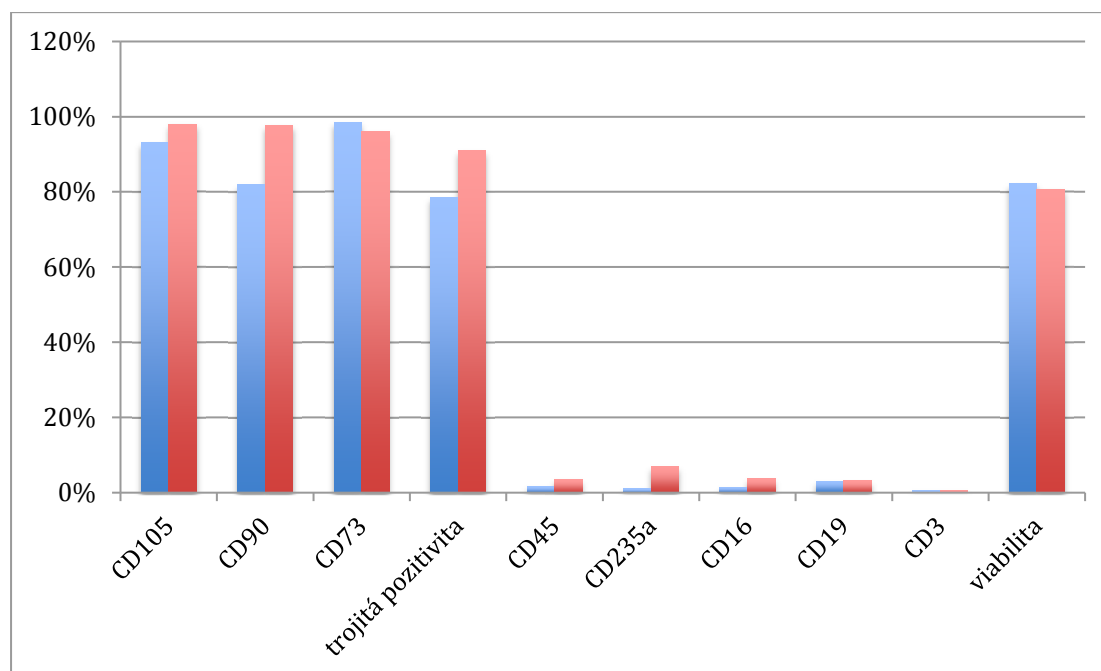
Verifikace povrchových znaků hMSC podle definice Dominici a Le Blanc (*Dominici M, 2006*) byla provedena v průběhu experimentů ortotopické transplantace hMSC do imunodeficientních potkanů (viz dále) a částečně publikována v práci *Pytlík R, 2017*. Povrchové znaky hMSC kultivovaných v CellGro™ + LS + S byly srovnávány s buňkami kultivovanými v alfa-MEM s FCS. Výsledky jsou uvedené v **Tab. 10** a na **Obr. 25**. Použity jsou výsledky z nepárových srovnání, výsledky z párových však byla obdobné.

Expresse sledovaných znaků CD73, CD90 a CD105 je na obou typech buněk výrazně vyšší než v práci *Pytlík R, 2009*. Buňky kultivované v alfa-MEM + FCS měly signifikantně vyšší expresi CD105 a CD90, zatímco exprese CD73 byla obdobná. Trojitá pozitivita CD73, CD90 a CD105 byla prokázána u zhruba 80% buněk kultivovaných v CellGro™ s LS a S oproti 90% buněk kultivovaných v alfa-MEM + FCS ( $p < 0.001$ ). Kontaminace hematopoetickými buňkami byla nízká.

**Tab. 10 - srovnání exprese povrchových znaků na hMSC pěstovaných v CellGro™ s lidským sérem a suplementy (modře) a alfa-MEM s fetálním telecím sérem (červeně). Nepárové testy, výsledky uvedeny jako mediány. Nepublikovaná tabulka.**

Médiu m	CD10 5	CD90	CD73	trojitá pozitivit a	CD4 5	CD235 a	CD1 6	CD1 9	CD3	viabilit a
CellGro	93,1 %	82%	98,4 %	78,6%	1,7%	1,1%	1,5%	3,1%	0,5 %	82,2%
alfaMEM	98%	97,7%	96%	91%	3,6%	6,9%	3,7%	3,2%	0,5 %	80,7%
p =	<b>0,007</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,13	<b>&lt;0,001</b>	0,37	<b>&lt;0,001</b>	0,11	0,64	0,72	0,77

**Obr. 25 - srovnání exprese povrchových znaků na hMSC pěstovaných v CellGro™ + LS + S (modře) a alfa-MEM + FCS (červeně). Nepárové testy, výsledky uvedeny jako mediány. Nepublikovaný obrázek.**



### 5.2.3.3. Profily genové exprese

#### I. Studie genové exprese mikročipovou metodou na platformě Illumina™.

Při užití restriktivních požadavků diferenciální genové exprese (rozdíl minimálně 2 log<sub>2</sub> v genové expresi při hladině významnosti p ≤ 0,001) bylo zjištěno 134 diferenciálně exprimovaných genů (65 overexprimovaných v médiu CellGro™ + LS + S a 69 v médiu alfa-MEM + FCS). Poměrně malé množství diferenciálně exprimovaných genů (zhruba z 11 000 sledovaných) znamená, že buňky pěstované v obou těchto médiích se v základních parametrech výrazně neliší.

Jednotlivé genové skupiny a signální dráhy byly dále studovány pomocí on-line programu **DAVID Bioinformatic Resources 6.7** (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). Na základě přiřazení diferenciálně exprimovaných genů do funkčních skupin bylo zjištěno (pomocí Benjaminiho korekce), že nejvíce obohacenými skupinami ve srovnání s celogenomovým zastoupením jsou následující:

- geny pro signální peptidy (celkem 31 genů,  $p = 0,00016$ )
- geny pro extracelulární proteiny (celkem 24 genů,  $p = 0,0009$ )
- geny pro secernované proteiny (celkem 20 genů,  $p = 0,0025$ )
- geny pro PPAR signální dráhu (celkem 6 genů,  $p = 0,0011$ )

Na základě přiřazení diferenciálně exprimovaných genů do klastrů funkčních skupin byly zkoumány následující klastry:

- klastr sdružující PPAR signální dráhu, metabolismus mastných kyselin a odpověď na léky
- klastr sdružující geny podílející se na osifikaci, kostním vývoji, skeletálním vývoji a vazbě růstových faktorů.

Zkoumáním klastru sdružujícího PPAR signální dráhu, metabolismus mastných kyselin a odpověď na léky bylo zjištěno, že tyto klastry obsahují celkem 10 genů (řada z nich se v jednotlivých funkčních skupinách daného klastru opakuje, **Tab. 11**). Z těchto deseti genů je osm overexprimováno v buňkách pěstovaných v alfa-MEM + FCS (s výjimkou lisyoxidázy a mitochondriální superoxididismutázy 2), přičemž v těchto buňkách je overexprimováno všech osm genů pro metabolismus mastných kyselin a signální dráhu PPAR, která se rovněž podílí na metabolismu lipidů. Signální dráha PPAR a geny v této signální dráze, které jsou overexprimovány v buňkách pěstovaných v alfa-MEM s fetálním telecím sérem, jsou znázorněny na **Obr. 26**.

Naproti tomu klastr sdružující geny podílející se na osifikaci, kostním vývoji, skeletálním vývoji a vazbě růstových faktorů obsahuje rovněž 10 genů (**Tab. 12**), ovšem zde osm z nich (s výjimkou kathepsinu K a povrchového znaku CD36) má zvýšenou expresi v buňkách pěstovaných ve CellGro™ s lidským sérem a suplementy.

Z uvedených srovnání dvou dosud zkoumaných klastrů vyplývá, že buňky kultivované v CellGro™ + LS + S mohou být vhodnější k použití ve zvolené indikaci (hojení kostí) než buňky kultivované v alfa-MEM + FCS, které jsou – alespoň dle diferenciálně exprimovaných genů – prediferencované spíše směrem k adipocytům.

**Tab. 11 - klastř genových skupin sdružující PPAR signální dráhu, metabolismus mastných kyselin a odpověď na léky. Nepublikovaná tabulka.**

---

### Signální dráha PPAR

Oficiální genový symbol	Název genu
CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
ACSL1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
FABP3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor)
FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
NR1H3	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3
PLTP	phospholipid transfer protein

---

### Metabolismus mastných kyselin

Oficiální genový symbol	Název genu
ACSL1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
FABP3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor)
FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
FADS1	fatty acid desaturase 1
OLAH	oleoyl-ACP hydrolase

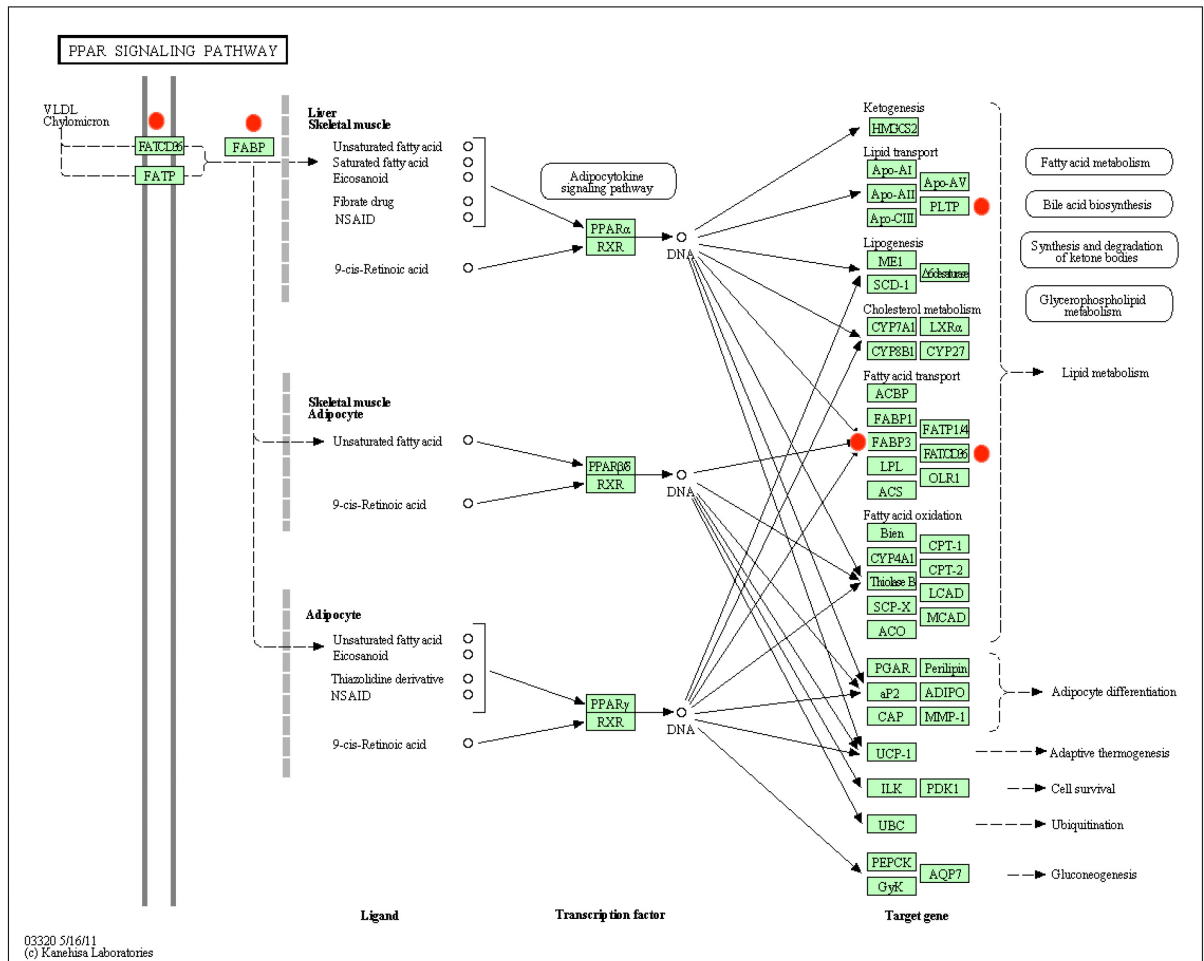
---

### Odpověď na léky

Oficiální genový symbol	Název genu
ACSL1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
FABP3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor)
FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
LOX	lysyl oxidase
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial



Obr. 26 – signální dráha PPAR. Červeně jsou vyznačeny geny, jejichž exprese je vyšší u hMSC kultivovaných v alfa-MEM + FCS a které tedy příznivě ovlivňují adipogenní diferenciaci. Nепublikovaný obrázek.



**Tab. 12 - klastr genových skupin sdružující PPAR signální dráhu, metabolismus mastných kyselin a odpověď na léky. Nepublikovaná tabulka.**

### Osifikace

Oficiální genový symbol	Název genu
CDH11	cadherin 11, type 2, OB cadherin (osteoblast)
CTSK	cathepsin K
COL1A1	collagen, type I, alpha-1
CTGF	connective tissue growth factor
IGFBP3	insuline-like growth factor binding protein 3

### Kostní vývoj

Oficiální genový symbol	Název genu
CDH11	cadherin 11, type 2, OB cadherin (osteoblast)
CTSK	cathepsin K
COL1A1	collagen, type I, alpha-1
CTGF	connective tissue growth factor
IGFBP3	insuline-like growth factor binding protein 3

### Skeletální (kosterní) vývoj

Oficiální genový symbol	Název genu
ARID5B	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)
CDH11	cadherin 11, type 2, OB cadherin (osteoblast)
CTSK	cathepsin K
COL1A1	collagen, type I, alpha-1
CTGF	connective tissue growth factor
IGFBP3	insuline-like growth factor binding protein 3

### Vazba růstových faktorů

Oficiální genový symbol	Název genu
CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
COL1A1	collagen, type I, alpha-1
CTGF	connective tissue growth factor
IGFBP3	insuline-like growth factor binding protein 3
IGFBP7	insuline-like growth factor binding protein 7
THBS1	thrombospondin 1

## II. Studie qRT-PCR

Metoda PCR v reálném čase byla použita pro kvantitativní stanovení exprese genů CDH11, CTSK, CTGF, IGFBP3, COL1A1, ARID5B. Vzorky použité ke studiím qRT-PCR byly tytéž, na kterých byly studovány profily genové exprese.

Naneštěstí výsledky qRT-PCR byly špatně hodnotitelné. U většího množství vzorků byla nedostatečná kvalita RNA (patrně došlo k rozmražení a opakovanému zamražení při převozu vzorků z IMG, protože všechny vzorky užití k analýze pomocí microarrayů byly optimální kvality). Bohužel nebyl čas a prostor ke kultivaci a RNA extrakci dalších vzorků MSC a bez ověření exprese klíčových genů alternativní metodikou nemohla být tato studie publikována.

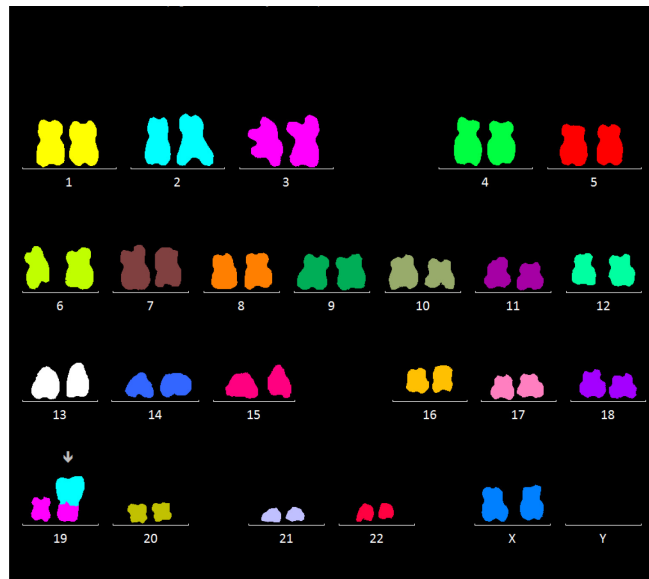
### 5.2.3.4. Cytogenetická charakterizace hMSC

Celkem bylo hodnoceno 13 vzorků, z toho 6 od zdravých dobrovolných dárců a 7 od pacientů s prokázanými lymfoidními malignitami. Celkem 12 vzorků bylo kultivovaných v CellGro™ s LS a S, 1 vzorek pak v alfa-MEM s FCS. Dostatek mitóz byl u devíti vzorků (5 od zdravých dobrovolníků a 4 od pacientů), vzorek kultivovaný v alfa-MEM s FCS byl bohužel mezi těmi, které neobsahovaly mitózy žádné. Celkový přehled vyšetření m-FISH je uveden v **Tab. 13**. Z devíti hodnotitelných vzorků byl pouze u čtyř (jeden zdravý dárců a tři pacienti) normální nález (46,XX/46,XY). Ve třech vzorcích (dva zdraví dárci, jeden pacient) byla kromě mitóz s normálním karyotypem nalezena vždy jedna mitóza s náhodnou chromozomovou aberací (neklonální změna). U dvou zdravých dárců byly však nalezeny změny klonální, v jednom případě šlo o dvě mitózy se stejnou abnormalitou, ve druhém o tři (**Obr. 27, 28**).

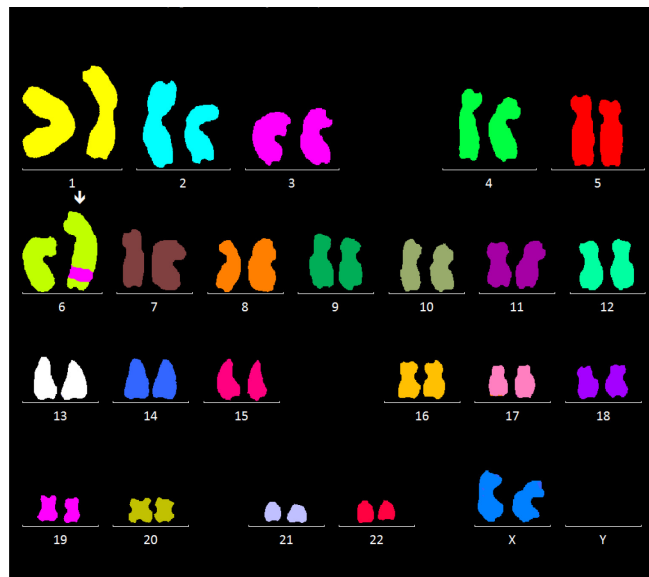
**Tab. 13 - přehled vyšetření buněk kultivovaných v CellGro™ s LS a S pomocí m-FISH. Ve sloupci pacient/zdravý dárců pacient = 1, zdravý dárců = 2, ve sloupci pohlaví muž = 1, žena = 2. Nepublikovaná tabulka.**

číslo pokusu	Pacient/zdravý dárců	pohlaví	věk	Postižení dřeně lymfomem	kultivace	Den stažení	Kolcemid	doba působení	počet bb.	mitosy	karyotyp
20/2015	2	2	23	0	CellGro	15	10 µg/ml	noc (17 hod)	19,0x10 <sup>6</sup>	žádné	
21/2015	1	2	51	1	CellGro	14	10 µg/ml	noc (17 hod)	24,5x10 <sup>6</sup>	žádné	
22/2015	2	1	48	0	CellGro	14	10 µg/ml	noc (17 hod)	18,5x10 <sup>6</sup>	málo mitos	46,XY,ins(5;6)(q?23;?) [1]/46,XY [14]
23/2015	2	1	45	0	CellGro	14	10 µg/ml	noc (17 hod)	23,5x10 <sup>6</sup>	dostatek mitos	46,XY [20]
24/2015	2	1	45	0	aMEM	14	10 µg/ml	noc (17 hod)	2,5x10 <sup>6</sup>	žádné	
25/2015	2	2	38	0	CellGro	14	10 µg/ml	noc (17 hod)	33,5x10 <sup>6</sup>	málo mitos	46,XX,t(15;16)(q26;?) [1]/46,XX [6]
26/2015	1	2	18	1	CellGro	12	10 µg/ml	noc (17 hod)	24,0x10 <sup>6</sup>	žádné	
27/2015	2	2	60	0	CellGro	16	10 µg/ml	noc (17 hod)	5,5x10 <sup>6</sup>	dostatek mitos	46,XX,der(19)t(2;19)(?:?p13.3)[3]/46,XX [6]
28/2015	2	2	24	0	CellGro	15	10 µg/ml	noc (17 hod)	18,0x10 <sup>6</sup>	dostatek mitos	46,XX,ins(6;3)(q?24;?) [2]/46,XX [22]
29/2015	1	1	50	0	CellGro	14	10 µg/ml	noc (17 hod)	29,5x10 <sup>6</sup>	málo mitos	46, XX
30/2015	1	1	63	0	CellGro	14	10 µg/ml	noc (17 hod)	13,5x10 <sup>6</sup>	dostatek mitos	45,XY,der(9)t(9;17)(q?33;?),-17[1]/46,XY [17]
31/2015	1	2	65	1	CellGro	14	10 µg/ml	noc (17 hod)	23,5x10 <sup>6</sup>	žádné	
10/2012	1	2	66	1	CellGro	14	10 µg/ml	noc (18 hod)	7,3x10 <sup>6</sup>	dostatek mitos	46, XX
16/2012	1	1	39	0	CellGro	16	10 µg/ml	noc (18 hod)	4,1x10 <sup>6</sup>	dostatek mitos	46, XX

Obr. 27 - chromozomová abnormalita pozorovaná ve třech mitózách u 59-leté zdravé ženy - zápis karyotypu: 46,XX,der(19)t(2;19)(?;?p13.3). Nepublikovaný obrázek.



Obr. 28 - chromozomová abnormalita pozorovaná ve dvou mitózách u 24-leté zdravé ženy - zápis karyotypu 46,XX,ins(6;3)(q?24;?). Nepublikovaný obrázek.



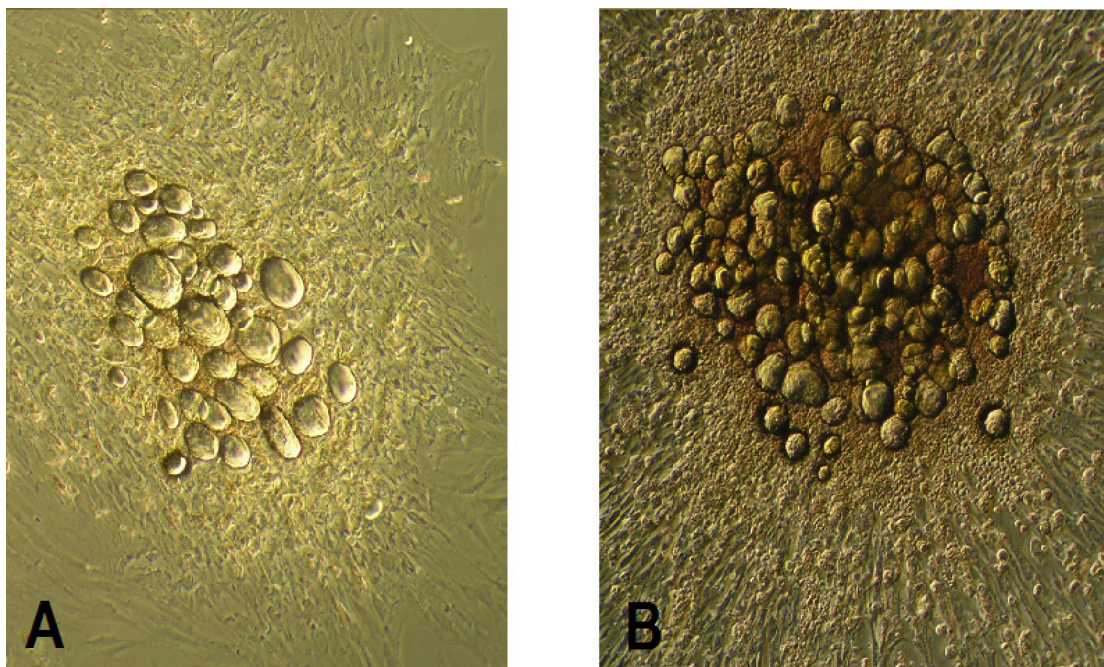
### 5.2.3.5 Podpora krvetvorby

Při ustavování kultur hMSC jsme pozorovali, že zhruba po 72 hodinách od zahájení kultury se kromě jednotlivých hMSC začínají objevovat i organizované shluky hMSC, tukových buněk a buněk krvetvorných. Tyto shluky, pracovně nazvané MSC-HC kolonie (směsné kolonie z mezenchymových a hematopoetických buněk) se vytvářely jak v alfa-MEM s FCS, tak i v CellGro™ s LS a S. Nalézány byly však pouze zhruba v 20% kultur.

MSC-HC kolonie se svým vzhledem lišily podle média, v němž byla kultura založena. U kultur v alfa-MEM s FCS byly kolonie bledé a obsahovaly pouze prekurzory granulocytů a makrofágů, u kultur v CellGro™ s LS a S byly kultury načervenalé, tedy i s obsahem erytroidních prekurzorů (**Obr. 29**).

Další vývoj MSC-HC kolonií se rovněž lišil podle způsobu kultivace. V alfa-MEM s FCS došlo k průběžnému odmývání krvetvorných buněk, což MSC-HC struktury zlikvidovalo a kolonie se pak rozvíjely jako běžné MSC kolonie. U buněk kultivovaných v CellGro™ + LS + S, kde nebyly nebyly hematopoetické buňky odmývány a uprostřed vyvíjejících se kolonií byly stále prokazatelné erytroidní ostrůvky. V jiných kulturách jsem pozorovali i obrovské, osteoklastům podobné buňky, které byly obklopené, ale nebyly přerostlé MSC. Vzhledem k nedostatku financí a času nebyly tyto procesy dále zkoumány.

**Obr. 29. Kolonie tvořené hMSC, zralými adipocyty a krvetvornými buňkami (MSC-HC, viz 1.2.2.) A - kultivace alfa-MEM + FCS, B - kultivace v CellGro™ + 10% LS + S. Nepublikovaný obrázek.**



### 5.2.3.6. Kryoprezervace hMSC pro pozdější použití

Byly provedeny studie kryoprezervace buněk kultivovaných v CellGro™ s LS a S se zaměřením zejména na nutnost FCS v kryoprezervačním roztoku. V těchto experimentech nebyl zjištěn rozdíl mezi alfa-MEM s 10% DMSO bez séra, mezi 90% fetálním telecím sérem s 10% DMSO a mezi médiem alfa-MEM: fetální telecí sérum 1:1 s 10% DMSO. Výsledky viability měřené klasickým způsobem (trypanová modř) po rozmražení byly o něco horší než výsledky před zamražením, ale šlo pouze o jednotky procent (**Tab. 14**).

**Tab. 14 - výsledky viability hMSC pěstovaných v CellGro™ + LS + S před zamražením a po rozmražení. Výsledky jsou uvedeny jako průměr a směrodatná odchylka, srovnání t-testem. Nepublikovaná tabulka.**

Timepoint	Viabilita	p = (srovnání s vzorkem před zamražením)
<b>Před zamražením</b>	90.3 ± 9%	
<b>Po rozmražení</b>		
90% FCS + 10% DMSO	84.6 ± 8.8%	<b>0.04</b>
90% alfa-MEM + 10% DMSO	83.3 ± 7.9%	<b>0.03</b>
45% FCS + 45% alfa-MEM + 10% DMSO	85.2 ± 9.5%	0.11

Dále jsme zjišťovali, zda CellGro™ jako základ mrazícího média není lepší než alfa-MEM a jestli lze nahradit fetální telecí sérum v mrazícím médiu sérem lidským. Zkoušeli jsme rovněž kryoprezervační médium speciálně vyvinuté pro hMSC. Testy viability zde byly prováděny pomocí sledování tvorby CFU-F při hustotě nasazení 3 buňky/cm<sup>2</sup> (tj. 180 buněk na 60 cm<sup>2</sup> Petriho misku). Výsledky jsou uvedeny v **Tab. 15 a 16**.

**Tabulka 15 - výsledky tvorby CFU-F kultivovaných v alfa-MEM s FCS, po rozmražení z různých kryoprezervačních roztoků. Srovnáváno s koloniformní kapacitou před zamražením. Výsledky jsou uvedené jako medián a rozmezí, srovnání Wilcoxonovým párovým neparametrickým testem. Nepublikovaná tabulka.**

Timepoint	Počet experimentů	CFU-F/60 cm <sup>2</sup>	P = (srovnání s vzorkem před zamražením)
<b>Před zamražením</b>	12	99.4 ± 59.7	
<b>Po rozmražení:</b>			
90% CellGro™ + 10% DMSO	11	65.9 ± 33.3	0.19
45% FCS + 45% alfa-MEM + 10% DMSO	12	59.5 ± 38.8	<b>0.03</b>
MSC freezing solution	3	66.2 ± 23.3	0.11

**Tab. 16 – výsledky tvorby CFU-F kultivovaných v CellGro™ s LS a S, po rozmražení z různých kryoprezervačních roztoků. Srovnáváno s koloniformní kapacitou před zamražením. Výsledky uvedené jako mediány a rozmezí, srovnání Wilcoxonovým párovým neparametrickým testem. Nepublikovaná tabulka.**

Timepoint	Počet experimentů	CFU-F/60 cm <sup>2</sup>	P = (srovnání s vzorkem před zamražením)
Před zamražením	12	16.3 ± 16.5	
Po rozmražení:			
90% lidské serum + 10% DMSO	12	6.8 ± 6	<b>0.03</b>
45% lidské serum + 45% CellGro™ + 10% DMSO	12	6.2 ± 6	<b>0.05</b>
90% CellGro™ + 10% DMSO	11	5.7 ± 6.5	0.10
MSC freezing solution	12	7.2 ± 6.6	0.13

V souhrnu vyplývá, že koloniformní kapacita ještě před zamražením je výrazně nižší u buněk pěstovaných v CellGro™ s LS a S než u buněk pěstovaných v alfa-MEM + FCS. Rovněž zamražení připravuje buňky o podstatnou část jejich koloniformní kapacity, a to zhruba o 33% u buněk pěstovaných v alfa-MEM + FCS a o více než 50% u buněk kultivovaných v CellGro™ + LS + S. Vlivy různých kryoprezervačních roztoků na koloniformní kapacitu buněk kultivovaných v alfa-MEM s FCS nebo CellGro™ + LS + S byly porovnány neparametrickým ANOVA testem, při němž nebyly zjištěny ani u jednoho typu hMSC rozdíly mezi jednotlivými médii ( $p = 0.87$  pro buňky kultivované v alfa-MEM + FCS,  $p = 0.95$  pro buňky kultivované v CellGro™ + LS + S). Lze tedy uzavřít, že hMSC vypěstované v CellGro™ + LS + S lze snadno kryoprezervovat v CellGro™, buď s lidským sérem nebo bez něj, ovšem s očekávanou ztrátou 50% koloniformních schopností. Speciální médium pro kryoprezervaci MSC nemá žádné zvláštní výhody oproti jiným zkoumaným médiím.

Dále byly provedeny experimenty s kryoprezervací za použití sericinu, ty však byly prováděny na buňkách kultivovaných v alfa-MEM s fetálním telecím sérem s kontrolami v podobě buněčné linie SAOS-2. Výsledky byly zveřejněny v publikaci **Verdánová M, 2014**.

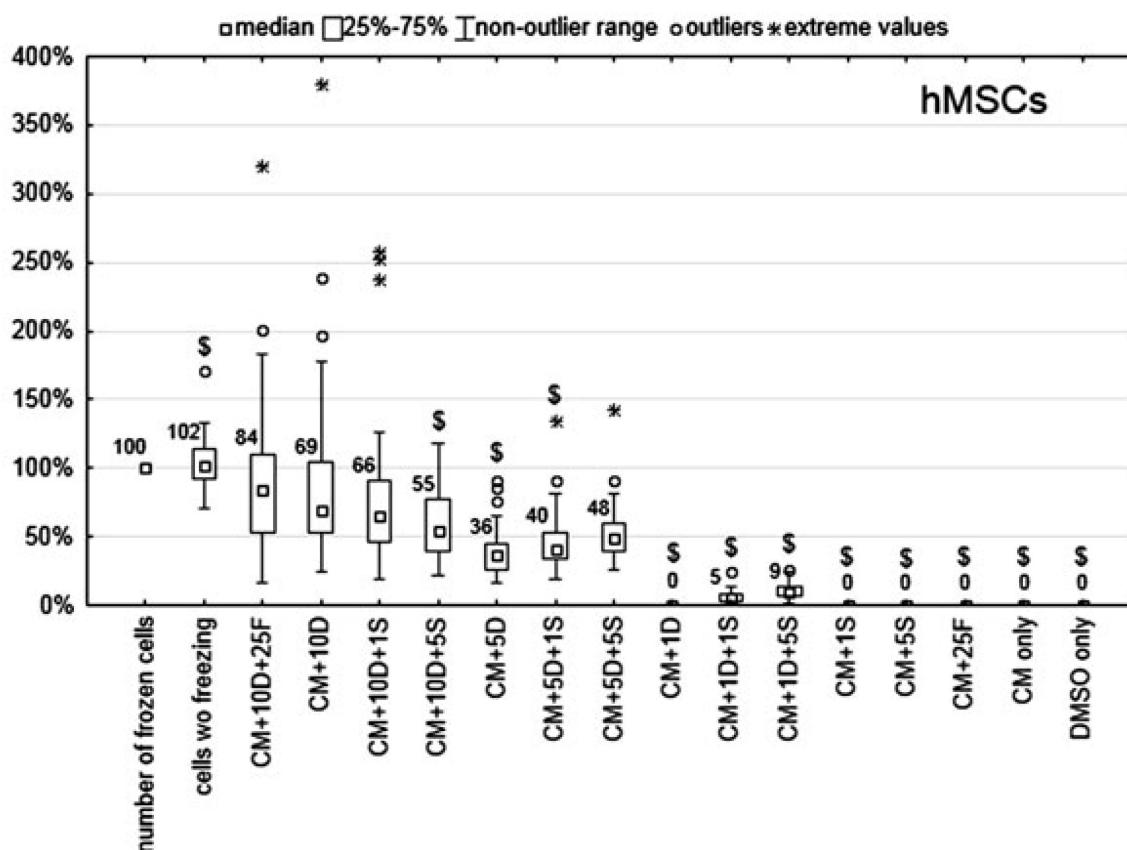
Seznam kryoprezervačních médií užitých v této publikaci je uveden v **Oddílu 4, Tab. 3**. Za standardní médium pro mražení hMSC jsme považovali 65% alfa-MEM s 10% DMSO a 25% FCS (CM+10D+25F). Výsledky byly srovnány s dalšími médii párovým neparametrickým Wilcoxonovým textem. Výsledky viability buněk zjišťované pomocí imunofluorescence jsou na **Obr. 30**, výsledky viability zjišťované pomocí tvorby CFU-F kolonií jsou na **Obr. 31**.

Největší množství buněk přežilo rozmražení po kryoprezervaci ve standardním médiu (84%). Podobné množství přežilo v médiu, kde bylo fetální telecí sérum zaměněno za sericin (66%,  $p = 0.238$ ) a také v samotném alfa-MEM s 10% DMSO (69%,  $p = 0.248$ ). Významně méně buněk přežilo při použití alfa-MEM s DMSO a 5% sericinem (55%,  $p = 0.012$ ). Při použití alfa-MEM s 5%



sericinem a 5% DMSO byly výsledky početně poněkud horší (44%), ale statistická signifikance zde nebyla ( $p = 0.504$ ), protože uvedené médium bylo použito jen v malém počtu experimentů. Ostatní média dosahovala významně horších výsledků v porovnání s alfa-MEM s 25% fetálním sérem a 10% DMSO, početně i statisticky.

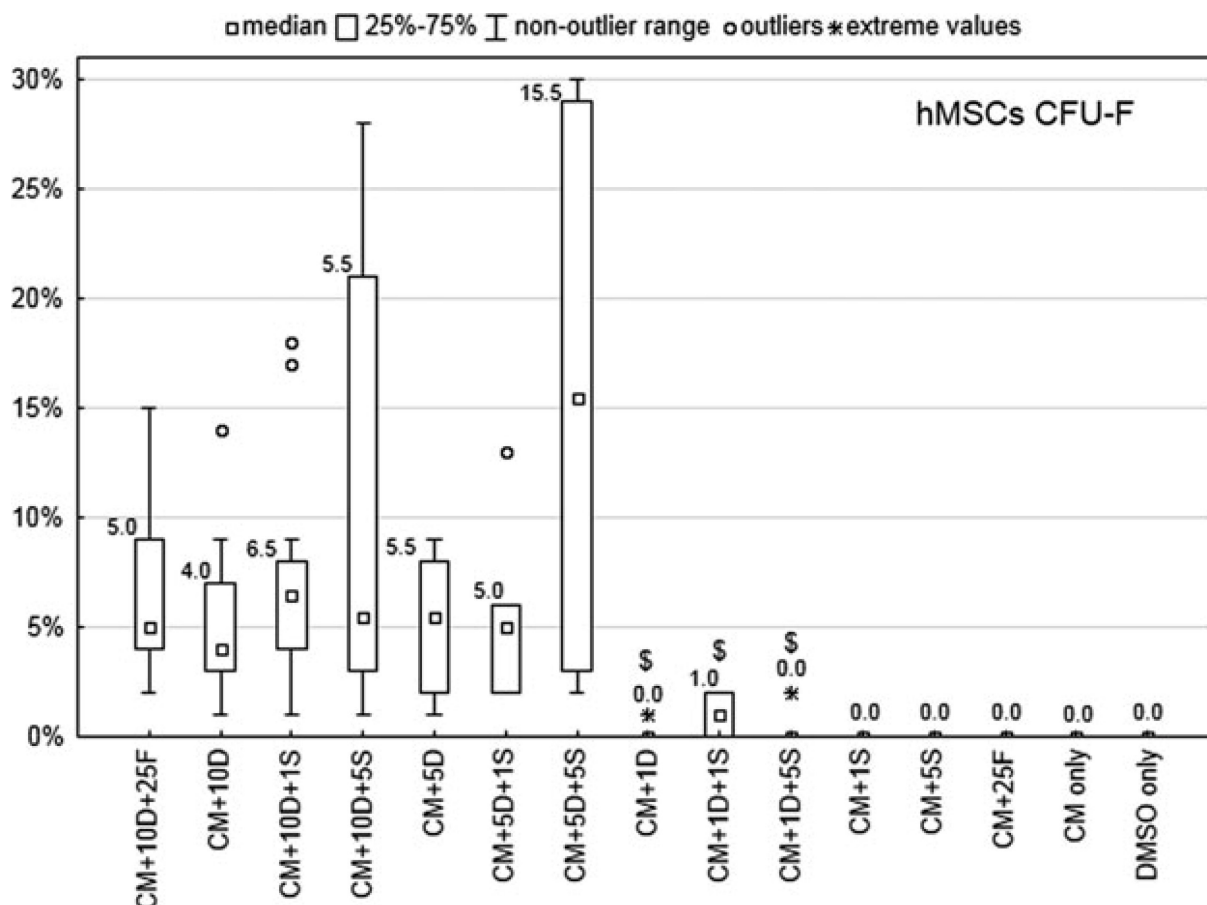
Obr. 30 - Verdánová M, 2014. Vitalita hMSC kultivovaných v alfa-MEM s FCS po zamražení v různých médiích. Vztaženo k celkovému počtu zamražených buněk (100%). Uvedeny jsou mediány ( $\square$ ), 25-75% percentily ( $\square$ ), rozmezí bez výrazně se lišících hodnot ( $\perp$ ), hodnoty mimo očekávané rozmezí ( $\circ$ ) a extrémní hodnoty (\*). \$ značí statisticky signifikantní rozdíl ( $p < 0.05$ ) při srovnání Wilcoxonovým testem.



Co se týče schopnosti tvorby CFU-F kolonií, ta byla nejlépe zachována v alfa-MEM s 5% DMSO a 5% sericinem (15.5 kolonií na 90 nasazených buněk), tento výsledek byl početně lepší než ve standardním médiu (5 kolonií na 90 buněk), ale nedosáhl statistické významnosti vzhledem k malému počtu provedených experimentů ( $p = 0.116$ ). Ve srovnání se standardním médiem byla výrazně hůře zachována koloniformní aktivita u médií obsahujících 1% DMSO. Pokud bylo DMSO 0% nebo 100%, žádná tvorba kolonií nebyla pozorována.



Obr. 31 - Verdánová M, 2014. Koloniformní kapacita hMSC kultivovaných v alfa-MEM s FCS a zamražených v různých médiích. Na ose x omylem uvedena procenta namísto absolutních čísel. Uvedeny jsou mediány (□), 25-75% percentily (▭), rozmezí bez výrazně se lišících hodnot (┌┐), hodnoty mimo očekávané rozmezí (○) a extrémní hodnoty (\*). \$ značí statisticky signifikantní rozdíl ( $p < 0.05$ ) při srovnání Wilcoxonovým testem.



Stručně shrnuto, v kryoprezervačních experimentech jsme zjistili, že kryoprezervační médium bez fetálního telecího či lidského séra je stejně dobré jako médium se sérem 1:1 nebo samotné sérum s DMSO, sericin patrně nepřináší žádnou výhodu a koloniformní kapacita po rozmražení klesá více než viabilita měřená pomocí imunofluorescence nebo trypanovou modří.

## 5.2.4. Preklinické experimenty na zvířecích modelech

### 5.2.4.1. Studie na imunodeficientních myších

Vzhledem k tomu, že studie v rámci práce *Pytlík R, 2009* byly popsány výše, budeme se zabývat studii krátkodobé a dlouhodobé toxicity, prováděnými pro stanovení bezpečnosti a účinnosti hMSC kultivovanými v CellGro™ s LS a S.

## I. Krátkodobé studie bezpečnosti buněčného preparátu na experimentálních zvířatech

Pro tyto pokusy bylo použito celkem 55 imunodeficientních myší NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J. Všechna použitá zvířata byly samice. Experimentální skupinu tvořily myši s implantovanou plazmatickou sraženinou s hMSC, jako dvě kontrolní skupiny sloužily myši bez implantace a myši s implantovanou plazmatickou sraženinou bez buněk. Dále byl několika myším implantován Cem-Ostetic®, tedy kostní tmel neutrálního pH, které obsahuje biokompatibilní kalciové soli, schválený FDA pro klinické užití, s buňkami či bez buněk. Jedné myši byly implantovány samotné hMSC v kultivačním médiu. Počet myší v jednotlivých skupinách je uveden v **Tab. 17**.

**Tab. 17 - počty NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J myší v jednotlivých skupinách použitých ve studiích krátkodobé toxicity hMSC pěstovaných v CellGro™ s LS a S. Nepublikovaná tabulka.**

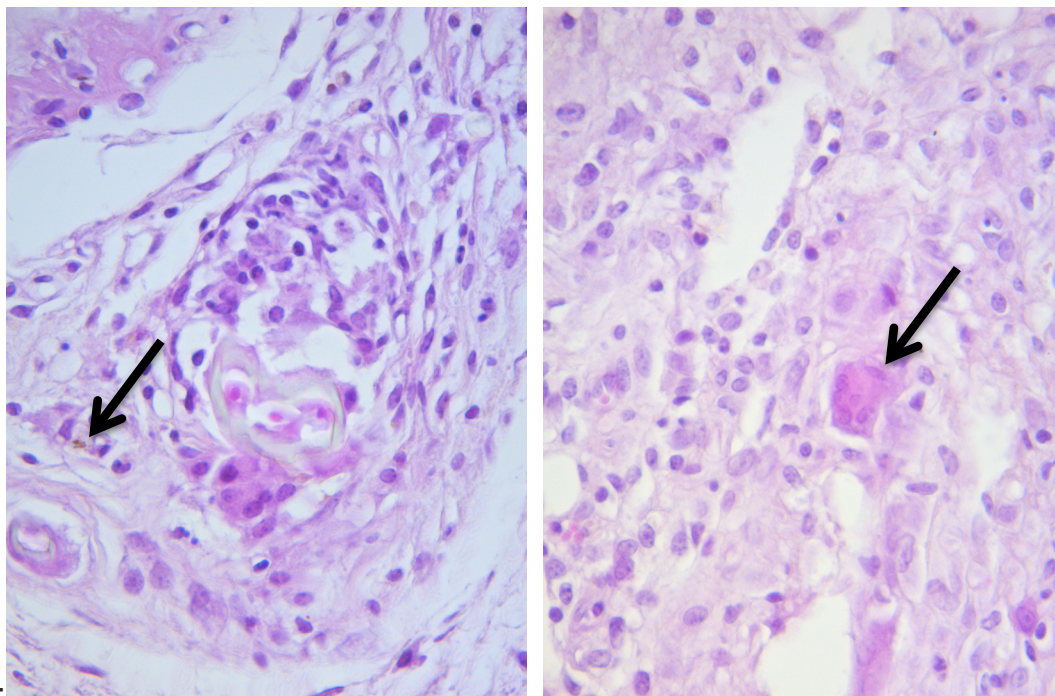
Skupina	Počet
Myši bez implantace	11
Myši s implantovanou plazmatickou sraženinou bez buněk	12
Myši s implantovanou plazmatickou sraženinou s hMSC	18
Myši s implantovaným Cem-Ostetic® bez buněk	5
Myši s implantovaným Cem-Ostetic® s hMSC	4
Myši s implantovanými hMSC v kultivačním médiu	1
<b>Celkem</b>	<b>55</b>

Všechny buňky byly implantované do zátylku myši. V průběhu 48 hodin došlo u myší po implantaci plazmatické sraženiny s buňkami či bez buněk a bez Cem-Ostetic® k rozpuštění sraženiny a na místě vznikla pouze zatvrdlina tvořená granulomatózním zánětem (**Obr. 32**).

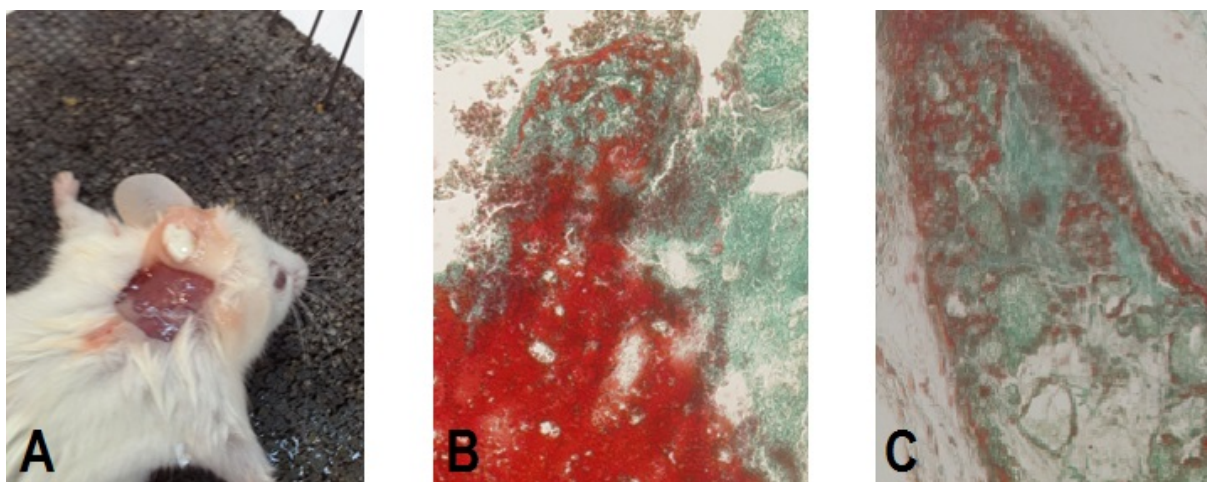
Při aplikaci preparátu Cem-Ostetic® nebo při aplikaci buněk smíšených s tímto preparátem dochází pochopitelně v místě aplikace k vytvoření kalcifikované struktury, v níž jsou hMSC retinovány. Retinované hMSC pak kostní tmel rozpouštějí a vytvářejí vaskularizovanou vazivovou tkáň (**Obr. 33**).

Myším s aplikovanými hMSC se vesměs dařilo dobře, v průběhu dvou až šesti týdnů jsme nepozorovali žádné úmrtí. Váhy před zahájením a po ukončení experimentu se nelišily mezi experimentální skupinou a kontrolními skupinami. V důsledku krevních odběrů docházelo u pokusných zvířat k očekávaném poklesu červeného krevního obrazu, míra poklesu se však statisticky nelišila u hlavní experimentální skupiny a skupin kontrolních. Při prohlídce parenchymatózních orgánů po skončení experimentu nebyly zjištěny žádné abnormality, ale ani žádné hMSC s výjimkou jednoho záchytu ve slezině (**Obr. 34, Stehlík D, 2015a**). Celkově tedy - až na granulomatózní záněty tvořené v místě aplikace hMSC - nebyly shledány žádné nepříznivé vlivy podaných buněk na experimentální zvířata. Na rozdíl od zvířat z experimentů dlouhodobých nebyly pozorovány žádné změny v chování ani při implantaci hMSC, ani při implantaci plazmatické sraženiny bez buněk, ani u kontrolní skupiny.

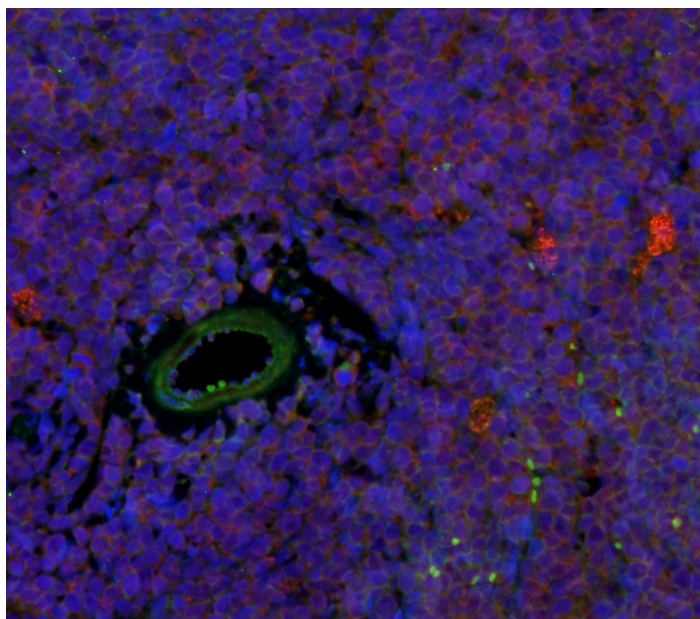
**Obr. 32 - granulomatózní reakce v místě aplikace plazmatické sraženiny s hMSC vykultivovanými v CellGro™ s LS a S do zátýlku NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J myši. Barvení hematoxylin-eozin, 400x. A - perioperačně zanesený zbytek chlupu (barví se žlutě, viz šipka), B - obrovská (Langhansova) buňka z cizích těles (šipka). Nepublikovaný obrázek.**



**Obr. 33 - implantace Cem-Ostetic® do zátýlku imunodeficientní myši. A - myš po usmrcení, B - Cem-Ostetic® bez buněk, C - Cem-Ostetic® s hMSC kultivovanými v CellGro™ + LS + S. Barvení Massonův zelený trichrom, kolagenní tkáň zeleně, kalcifikace červeně, 100x. Nepublikovaný obrázek.**



Obr. 34 - Stehlík D, 2015a. hMSC zachycené ve slezině zvířete 131113-3. Lidské buňky detekovány antimitochondriální protilátkou s fluorescenčním barvivem PE-Cy5 (červeně). Jádra modře (DAPI), céva zeleně (anti-CD31, FITC).



## II. Dlouhodobé studie bezpečnosti buněčného preparátu na experimentálních zvířatech

Dlouhodobé studie byly prováděny na párech ze stejného vrhu. Cílem bylo zjistit přežití zvířat, jejich schopnost breedingu, dále pak tvorbu eventuálních nádorů a přítomnost lidských buněk v místě aplikace sraženiny s hMSC a přítomnost lidských buněk v parenchymatózních orgánech.

Celkem bylo použito 11 párů zvířat. Čtyřem experimentálními páry byly aplikovány hMSC v počtu  $10 \times 10^6$  v plazmatické sraženině, sedmi kontrolním páry byla aplikována buď pouze plazmatická sraženina nebo byly bez implantace. Páry byly sledovány po dobu 6-10 měsíců. K hodnocení statistických výsledků byly použity t-testy vzhledem k normálnímu rozložení dat, při hodnocení skupin byl vzhledem k malému počtu případů použit 2-stranný Fischerův přesný test.

V průběhu experimentu došlo k úhynu celkem 6 zvířat z 22 (27%), z toho bylo 5 samců (45% z 11 samců). Příčinou úmrtí byla ve všech případech vzájemná agresivita, která je u použitého kmene myší běžná. Samice vesměs zabíjely samce, v jednom případě (pár č. 3 z experimentální skupiny) došlo k úhynu obou zvířat.

Více zvířat zemřelo v experimentální skupině ( $5/8 = 62,5\%$  oproti  $1/14 = 7\%$ ,  $p = 0.01$  dle 2-stranného Fischerova přesného testu). Rovněž rozdíl v úmrtí samců byl významný ( $4/4$  v.  $1/7$ ,  $p = 0.015$  dle 2-stranného Fischerova přesného testu).



Co se týče váhy zvířat na konci pokusu, počtu vrhů a počtu mláďat v jednom vrhu se od sebe pokusná a kontrolní skupiny nelišily, pokud byly vyřazeny páry, kde došlo k časnému úmrtí jednoho či obou zvířat. V histologických vyšetřeních zvířat na konci experimentu nebyly žádné orgánové patologie (kromě násilně způsobených) a nebyly zachyceny žádné lidské buňky. Souhrnné výsledky jsou uvedené v **Tab. 18**.

**Tab. 18 – kvantitativní zhodnocení dlouhodobých pokusů s implantací hMSC kultivovaných v CellGro™ + LS + S, podaných heterotopicky v plazmatické sraženině imunodeficientním myším. \*) páry s předčasným úmrtím jednoho či obou zvířat vyloučeny, \*\*) žádný ze samců se nedožil konce experimentu. Nepublikovaná tabulka.**

	Skupiny		P =
	Experimentální	Kontrolní	
Počet párů	4	7	
Počet vrhů*)	3.5 ± 0.7	2.9 ± 0.7	0.28
Celkový počet mláďat*)	18.5 ± 12	20.4 ± 7.7	0.78
Počet mláďat na vrh*)	5 ± 2.4	6.6 ± 2	0.37
Rozdíl váhy na začátku a konci experimentu – samci	Nelze**)	1.9 ± 0.2 g	
Rozdíl váhy na začátku a konci experimentu: samice	4.3 ± 1.1 g	4.0 ± 0.3 g	0.52

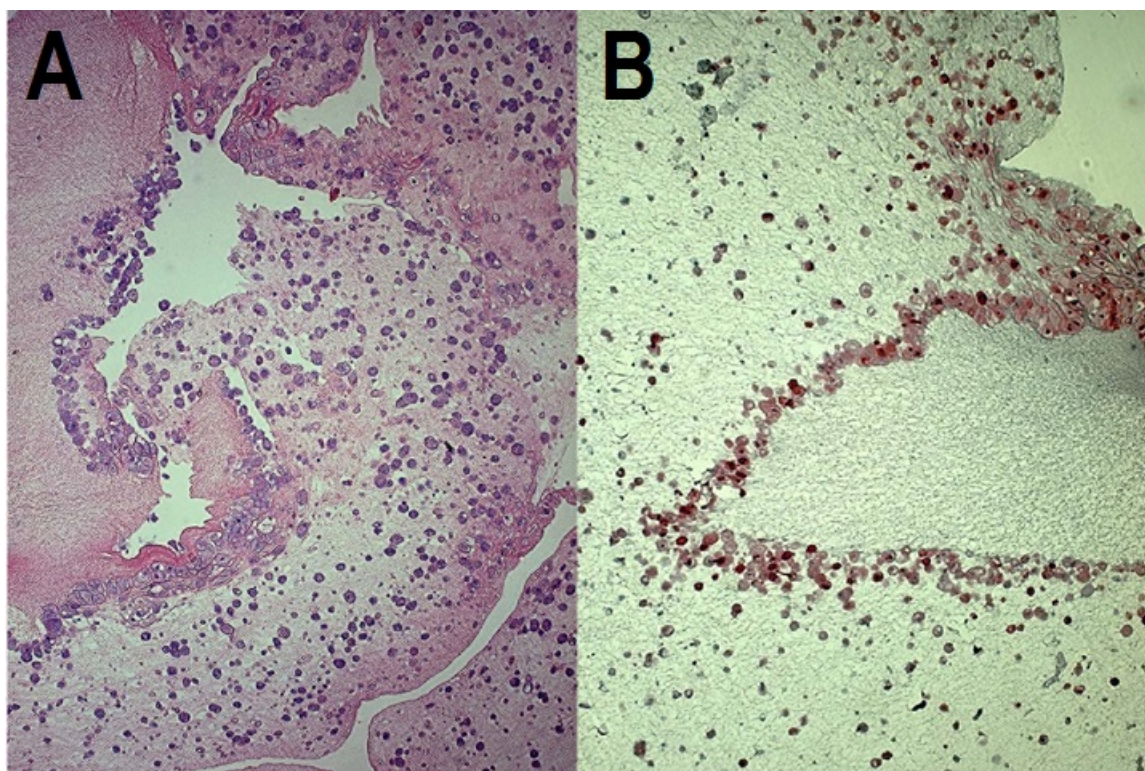
#### 5.2.4.2. Studie na imunodeficientních potkanech

Pro studie ortotopické implantace hMSC vypěstovaných v CellGro™ s LS a S do kritického femorálního defektu u rnu-rnu potkanů jsme použili celkem 44 zvířat, která byla náhodně rozdělena do čtyř kohort: 8-týdenní experimentální, 8-týdenní kontrolní, 16-týdenní experimentální a 16-týdenní kontrolní. Experimentálním kohortám byly aplikovány hMSC v plazmatické sraženině, kontrolním kohortám plazmatické sraženiny bez buněk. V předběžných experimentech bylo zjištěno, že retence buněk v plazmatické sraženině je dobrá a že hMSC jsou schopné zde přežít a proliferovat minimálně po 7 dní (**Obr. 35**).

Metodika je podrobně popsána výše. Kultivační médium bylo suplementováno pouze šesti suplementy, tj. askorbátem, dexamethasonem, inzulinem, EGF, PDGF-BB a FGF2, bez M-CSF. Výsledky byly publikovány v práci **Pytlík R, 2017**.

Mononukleární buňky z dřevové krve (BMMC) pro kultivaci hMSC byly odebrány celkem od 13 dárců, z čehož bylo 5 mužů a 8 žen s věkovým průměrem 47 ± 14 let (rozmezí, 27-65 let). Šest dárců byli pacienti s dosud neléčenou lymfoidní malignitou, ovšem pouze dva z nich měli minimální infiltraci kostní dřevě; sedm byli zdraví dobrovolníci. Podrobnější charakteristika jednotlivých dárců je v **Tab. 19**.

Obr. 35 - Pytlík R, 2017 - lidské MSC v plazmatické sraženině. A-barvení hemotoxylin-eosin, B-anti-Ki67 imunohistochemické barvení znázorňuje proliferující buňky. Zvětšení 400x.



Tab. 19 - Pytlík R, 2017. Seznam dárců pro pokusy ortotopické implantace hMSC na plazmatických sraženinách do femorálního segmentálního defektu imunodeficientních potkanů. DLBCL = difusní velkobuněčný B-lymfom, FL = folikulární lymfom, NA = nelze aplikovat, FACS = průtoková cytometrie.

Číslo dárce	Typ dárce	Pohlaví	věk	Diagnóza	Postižení kostní dřeně
1	Pacient	Muž	66	DLBCL	Ne
2	Pacient	Muž	62	FL	Ne
3	Dobrovolník	Muž	47	NA	NA
4	Pacient	Žena	55	FL	Ne
5	Dobrovolník	Žena	31	NA	NA
6	Dobrovolník	Žena	27	NA	NA
7	Dobrovolník	Žena	52	NA	NA
8	Pacient	Žena	59	FL	1.4% dle FACS
9	Pacient	Muž	39	FL	Ne
10	Pacient	Muž	62	FL	3.4% dle FACS
11	Dobrovolník	Žena	51	NA	NA
12	Dobrovolník	Žena	28	NA	NA
13	Dobrovolník	Žena	32	NA	NA

Od každého dárce kromě prvního byl dostatek buněk pro dvě sraženiny a v 19 z 25 sraženin (76%) bylo dosaženo plánovaného množství  $10 \times 10^6$  buněk.

Tam, kde bylo možno, byly sraženiny implantovány párově, tj. jedna do 8-týdenní experimentální kohorty, jedna do 16-týdenní experimentální kohorty. Viabilita buněk měřená trypanovou modří v Burkerově komůrce byla konzistentně nad 90% a medián CD105+CD90+CD73+ buněk bylo 82.9% (rozmezí, 57.8 - 94.9%).

Rozdělení potkanů do jednotlivých skupin probíhalo randomizovaně. Chirurgické výsledky jsou přehledně uvedeny v **Tab. 20** a jednotlivé fáze operačního postupu jsou dokumentovány na **Obr. 36**. Celkem bylo hodnotitelných 40 ze 44 zvířat (91%). Při pooperačním měření měly defekty průměrnou velikost  $4.2 \pm 0.5$  mm, beze rozdílů mezi čtyřmi kohortami ( $p = 0.30$ ).

**Tab. 20. Chirurgické výsledky. tý = týden, exp = experimentální kohorta, kon = kontrolní kohorta.**

	Skupiny			
	8-tý exp	8-tý kont	16-tý exp	16-tý kont
Celkem operováno	13	9	12	10
Perioperační mortalita	0	0	0	2
Selhání osteosyntézy	1	0	1	0
Hodnotitelná zvířata	12	9	11	8

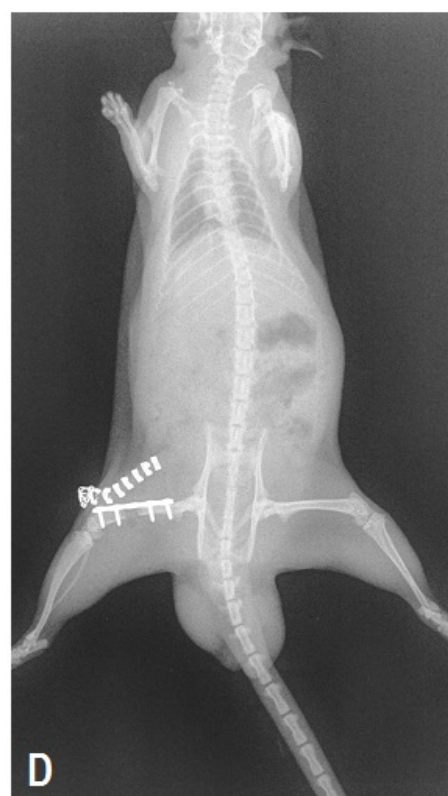
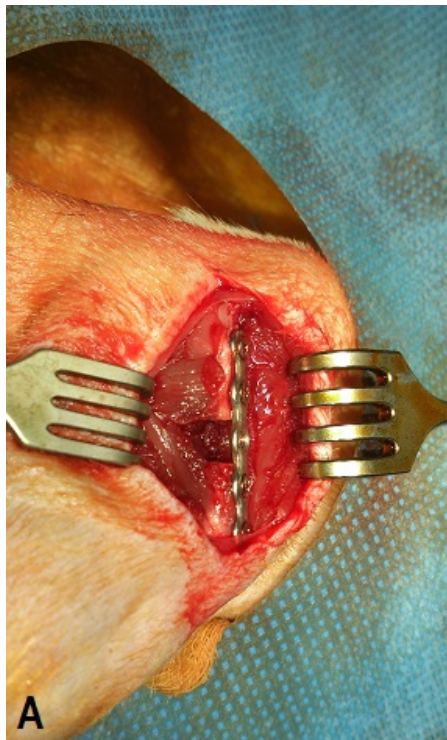
RTG, mikroCT a histomorfometrická vyšetření ukázala, že jak v kohortách experimentálních, tak v kohortách kontrolních se někteří potkani hojili lépe a jiní hůře. Příklady jsou uvedené na **Obr. 37 a 38**. Lidské buňky byly přítomny, ale bylo jich málo a byly výhradně na místech, kde ještě nedošlo k novotvorbě kosti (**Obr. 38D**). V histologických preparátech nebyly patrné žádné známky zánětu či lokálního dráždění v podobě např. obrovských vícejaderných buněk z kostní dřene. Přehledně jsou výsledky uvedené v **Tab. 21**.

Co se týče vyšetření na formaci nových cév, byla provedena pomocí myšího aktinu a spočítány v osmi a šestnáctitýdenních kohortách, v experimentálních skupinách byli dohromady hodnoceni dárce i dobrovolníci. V osmi týdnech byl trend k lepší tvorbě cév u experimentální kohorty ( $121 \pm 46$  vs.  $71 \pm 26$  cév,  $p = 0.07$ ), který dosáhl statistické významnosti po šestnácti týdnech ( $177 \pm 56$  vs.  $92 \pm 13$  cév,  $p = 0.01$ ). Viz též **Obr. 39**.

Co se týče histologie ostatních orgánů, nebyly zde zachyceny žádné lidské buňky ani žádné abnormality tumorózního, zánětlivého či degenerativního charakteru. Výjimku tvořilo zvíře č. 44 (zdravý dárcce 13 v 16-týdenní experimentální kohortě), u něhož byla nalezena proliferace vřetenitých až pleomorfních mezenchymových buněk se středně výraznou anizocytózou a anizokaryocytózou. Imunohistochemickým barvením bylo prokázáno, že se jedná o myší buňky a mezenchymový charakter byl ověřen protilátkou proti vimentinu (pozitivní) a proti CD66 (negativní). Histologický obraz byl slučitelný s reaktivní či reparativní fibroplázií, i když známky předchozího poškození či podráždění nebyly patrné (**Obr. 40**).

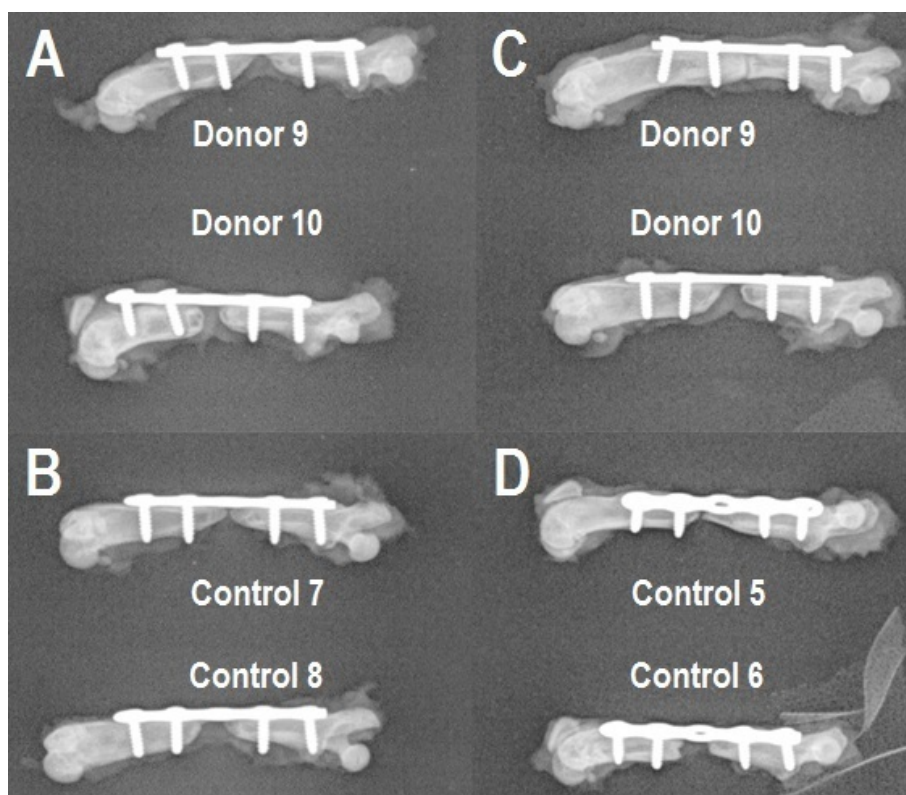


Obr. 36 - průběh operace imunodeficientních potkanů. A, vytvoření femorálního defektu, B, vnášení plazmatické sraženiny s buňkami nebo bez buněk, C = po vnesení plazmatické sraženiny, D = pooperační rentgenové vyšetření, osteosyntéza s patrným defektem a sešití kůže staplerem (kovovými svorkami). Nepublikovaný obrázek.





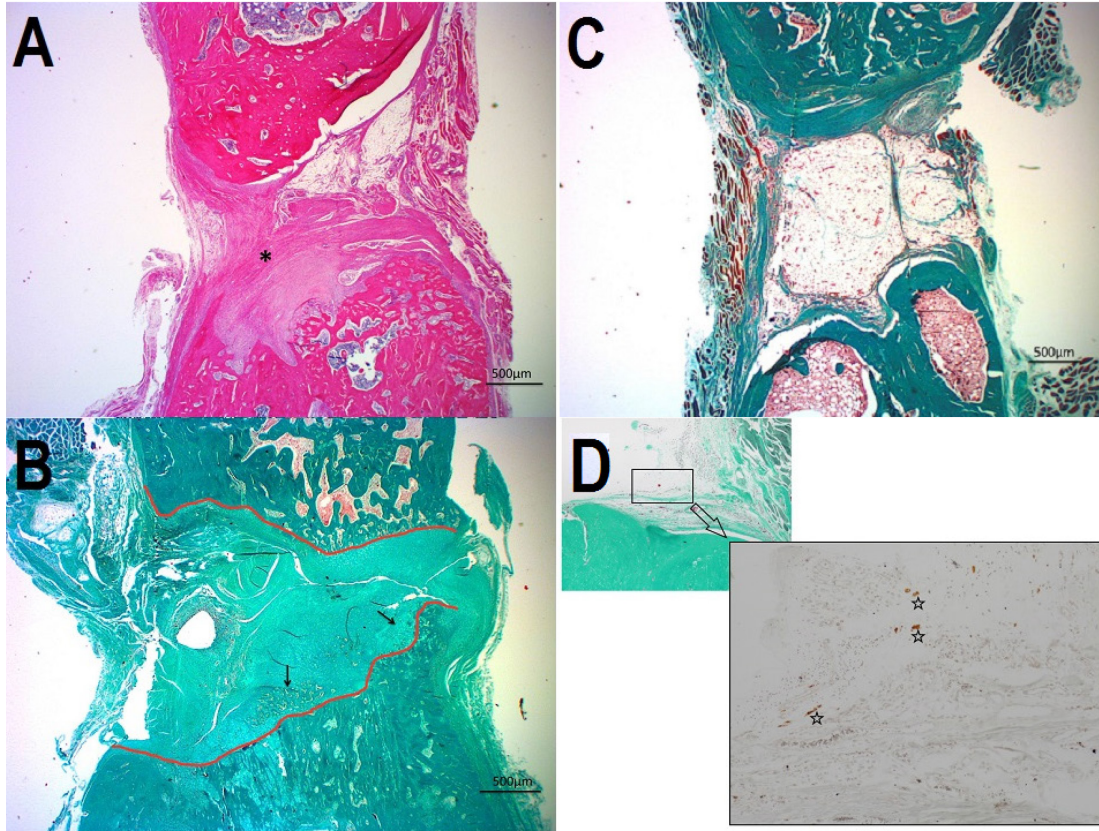
Obr. 37 - Pytlík R, 2017. příklady dobrého a horšího hojení v experimentálních a kontrolních kohortách dle RTG. A - 8-týdenní experimentální kohorta, B - 8-týdenní kontrolní kohorta, C - 16-týdenní experimentální kohorta, D - 16-týdenní kontrolní kohorta.



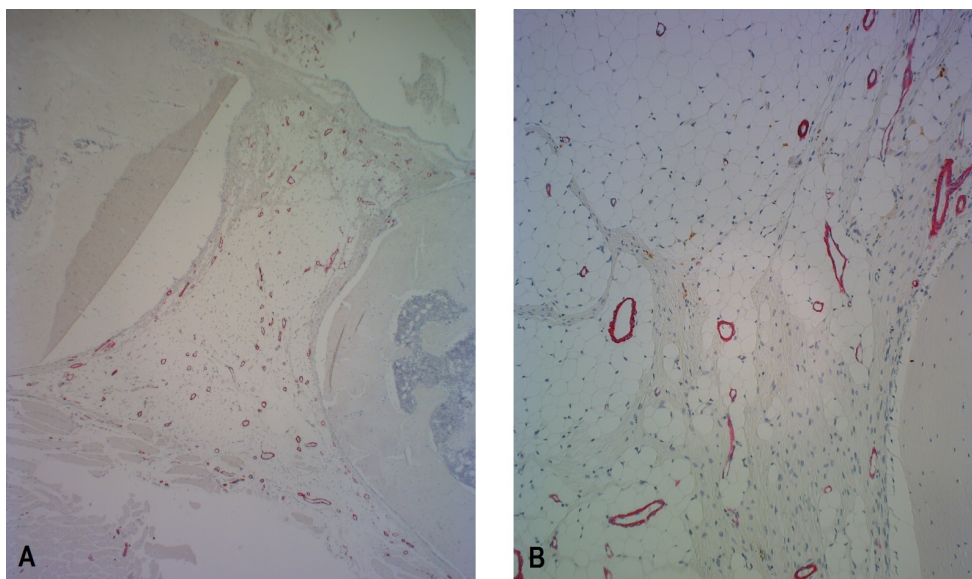
Tab. 21 - Pytlík R, 2017. Srovnání hojení kostí v jednotlivých kohortách. Tý = týden, exp = experimentální (pacienti i dobrovolní zdraví dárce dohromady), kon = kontrolní, dob = dobrovolníci, RTG = rentgen, HM = histometrie, BV/TV = poměr novotvořené kosti k celkové velikosti vytvořeného defektu, mikroCT = mikro počítačová tomografie.

Kohorta					
	1.	2.	3.	P =	P =
	8-tý exp	8-tý kon	8-tý dob	1 v. 2	2 v. 3
Novotvorba kosti (RTG)	2.4 ± 1.2 mm	1.6 ± 1.0 mm	2.7 ± 1.0 mm	0.12	<b>0.05</b>
Novotvorba kosti (HM)	1.36 ± 0.42 mm <sup>2</sup>	0.88 ± 0.33 mm <sup>2</sup>	1.61 ± 0.25 mm <sup>2</sup>	0.08	<b>0.015</b>
BV/TV (mikroCT)	20 ± 4%	18 ± 3%	22 ± 5%	0.15	0.09
Kohorta					
	1.	2.	3.	P =	P =
	16-tý exp	16-tý kon	16-tý dob	1 v. 2	2 v. 3
Novotvorba kosti (RTG)	2.2 ± 1.0 mm	2.2 ± 1.0 mm	1.9 ± 0.6 mm	0.99	0.52
Novotvorba kosti (HM)	1.28 ± 0.56 mm <sup>2</sup>	1.06 ± 0.34 mm <sup>2</sup>	1.16 ± 0.09 mm <sup>2</sup>	0.48	0.63
BV/TV (mikroCT)	21 ± 6%	20 ± 3%	20 ± 4%	0.26	0.46

Obr. 38 - Pytlík R, 2017. Mikroskopie kostního hojení. A - kontrola č. 3, 8-týdenní kohorta: příklad dobrého hojení s fibrózním kalem (hvězdička) a reziduální tukovou tkání (uprostřed nahoře). B - dárce č. 12, 8-týdenní experimentální kohorta: příklad dobrého hojení s fibrózním kalem, místy chrupavčité diferenciaci (levá šipka) a vytváření kostní tkáně (pravá šipka). Linie pro histomorfometrické vyšetření vyznačeny červeně. C = kontrola č. 4, 16-týdenní kohorta, příklad špatného hojení s vaskularizovanou tukovou tkání vyplňující většinu defektu. D - barvení na lidské mitochondrie. Barvení - A - hematoxylin-eosin, B, C - Goldnerův trichrom, D - lidský nestin.

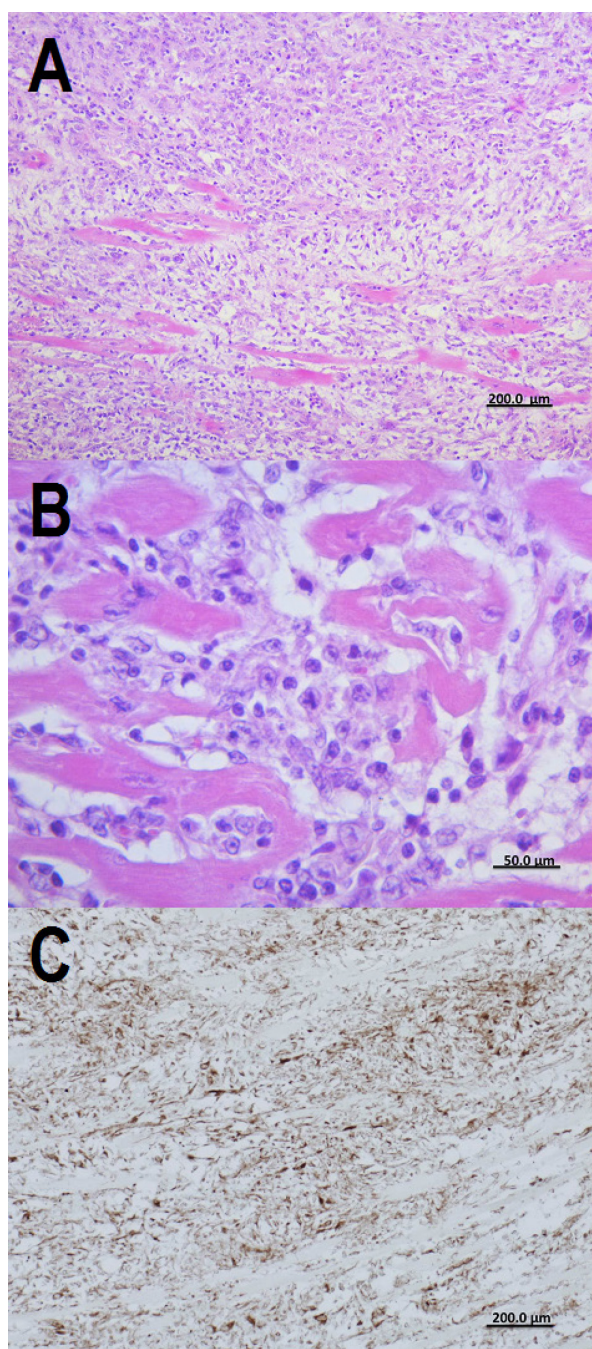


Obr. 39 - Pytlík R, 2017. Vaskulogeneza v kostním defektu. Barveno protilátkou proti myššímu aktinu. A = 100x, B = 200x.





Obr. 40 – Pytlík *et al*, 2017. Reaktivní či reparativní fibroplázie ve zvířeti č. 44 (16-týdenní experimentální kohorta, zdravý dárce č. 13). A a C - zvětšení 100x, B zvětšení 400x. Barvení: A, B - hematoxylin-eozin, C - protilátka proti myšimu vimentinu.



Celkově lze výsledky z ortotopického preklinického modelu aplikace hMSC kultivovaných v CellGro™ s LS a S do kritického femorálního defektu u imunodeficientních potkanů interpretovat následovně:

- v osmitýdenních kohortách lidské buňky pomáhaly hojení kosti, což bylo patrné z RTG, mikroCT a histomorfometrických vyšetření. Vzhledem k malému počtu experimentů byly výsledky signifikantní pouze v některých případech a pouze pokud byly výsledky kontrolní

kohorty srovnávány s implantovanými buňkami od zdravých dobrovolníků.

- v šestnáctitýdenních kohortách nebyl efekt lidských buněk na hojení kosti patrný, avšak byl patrný na zlepšené neovaskularizaci v reziduálním defektu.
- buňky prokazatelně přežívaly po celou dobu experimentu v reziduální fibrózní tkáni ve vytvořeném defektu.
- pokud hMSC migrují do jiných orgánů, nejsou v nich prokazatelné a nemají žádné lokální ani systémové nežádoucí účinky.

### 5.2.5. Připravenost preparátu hMSC kultivovaných v CellGro™ s lidským sérem a suplementy pro klinickou studii.

Jak již výše zmíněno, v průběhu vývoje buněčného produktu byl vyvinut i postup umožňující GMP přípravu hMSC kultivovaných v CellGro™ s lidským sérem a suplementy, včetně postupu umožňujícího robotizaci procesu. Research grade suplementy byly bez ztráty účinnosti kultivace zaměněny za suplementy clinical grade. Problematická situace nastala po zhodnocení výsledků cytogenetických vyšetření, která vznesla nejen pochyby ohledně bezpečnosti produktu, ale i původu cytogenetických abnormalit, zejména co se týče senescence námi kultivovaných hMSC. Studie bezpečnosti na zvířatech nebyly z důvodu nedostatku financí nebyly provedeny dle lékopisu na certifikovaném pracovišti. Tyto okolnosti znamenají, že vyvinutý hMSC produkt není v tuto chvíli plně připraven ke klinické fázi vývoje.

## 6. Diskuse

### 6.1. Využití nemanipulovaných BMBC v léčbě infarktu myokardu a ischemické choroby dolních končetin

Mononukleární buňky z kostní dřeně (BMBC) sloužily dlouho jako zdroj štěpu k transplantacím krvetvorných buněk, autologním i alogenním. Dnes již je jejich použití v této indikaci spíše výjimečné, protože k transplantacím krvetvorných buněk se většinou používají mobilizované progenitorové buňky z periferní krve (**Gratwohl A, 2005**). Nicméně postup odběru i zpracování BMBC byl dobře standardizován a BMBC proto posloužily průkopníkům regenerativní medicíny v jejich prvních studiích. Podkladem pro tyto studie byl předpoklad, že spolu s malým množstvím MSC budou do postižených orgánů "transplantovány" i vaskulární buňky či prekursory, které jsou rovněž v BMBC přítomny (**Maltais S, 2011**). Později, zejména v kardiologických indikacích, se přešlo k podávání MSC, které by dle pokusů na zvířatech měly mít schopnost diferencovat se i v kardiomyocyty (**Fukuda K, 2005**).

Co se týče studií kardiovaskulárních onemocnění, BMBC byly experimentálně použity v léčbě akutního infarktu myokardu (**Arnous S, 2012**), chronického srdečního selhávání (**Fischer SA, 2016**), ischemické choroby dolních končetin včetně diabetické nohy (**Dubský M, 2013; Peeters Weem SM, 2015**) i ischemické cévní mozkové příhody (**Kumar A, 2017**).

V první naší studii (**Pěnička M, 2007**) jsme se zabývali léčbou pacientů s akutním infarktem myokardu. Šlo o poměrně ambiciózní projekt, cílem bylo léčit 20-40 pacientů ve standardním (běžná péče) i experimentálním rameni (transplantace BMBC 4.-11. den po infarktu). Studie byla randomizovaná 2:1 ve prospěch buněčné léčby. Nakonec byla předčasně ukončena po zahrnutí 27 pacientů z důvodu život ohrožujících nežádoucích účinků u dvou nemocných při odběru BMBC. Nepodařilo se prokázat pozitivní vliv BMBC na zlepšení funkce levé komory srdeční ani na zmenšení rozsahu infarktu. Z pozdějšího pohledu a z pohledu jiných studií se zdá, že vyšší počet komplikací při odběru BMBC byl způsoben chybou malých čísel a že při jistých úpravách protokolu by bylo bývalo možné a vhodné ve studii pokračovat - k tomu ovšem popravdě řečeno chyběla vůle hlavních investigátorů. Stejně by se však patrně nepodařilo prokázat hojivý efekt BMBC. Randomizované studie, kterých mimochodem není mnoho, přinesly, pravda, jistá očekávání. Např. studie TCT-STAMI ukázala zhruba 5% zlepšení ejekční frakce u pacientů léčených BMBC proti kontrolám (**Ge J, 2006**), REPAIR-AMI ukázala zlepšení funkce levé komory srdeční oproti kontrolám po čtyřech měsících a snížení kumulativní incidence úmrtí, reinfarktu či nutnosti revaskularizace (**Schachniger V, 2006a; Schachniger V, 2006b**). Pacienti s těžším infarktem profitovali v této studii více než pacienti s infarktem lehčím. V LEUVEN-AMI studii došlo sice ke snížení velikosti infarktu a zlepšení regionální kinetiky levé komory srdeční v důsledku buněčné terapie, ovšem celková ejekční frakce se vůči kontrolám nezlepšila (**Janssens S, 2006**). Metaanalýza z roku 2014 zahrнула celkem 22 klinických studií s 1596 pacienty a konstatovala, že léčba je bezpečná a že ejekční frakce levé komory srdeční byla u pacientů léčených

mononukleárními buňkami oproti kontrolám zlepšena o 2.1% ( $p = 0.004$ ), srdeční objem na konci systoly byl snížen o 4.05 ml ( $p = 0.006$ ) a velikost infarktu byla redukována o 2.1% ( $p = 0.004$ ). Bohužel však nebylo prokázáno žádné zlepšení celkového přežití či snížení závažných kardiálních a cerebrovaskulárních příhod při mediánu sledování šest měsíců (**de Jong R, 2014**). Z jiné metaanalýzy randomizovaných studií u infarktu myokardu léčeného buď pomocí BMMC nebo MSC (celkem 41 studií dohromady s 2732 nemocnými) opět vyplývá, že léčba je zcela bezpečná (tedy včetně odběru), ovšem nemá žádný pozitivní vliv na celkové přežití, morbiditu po randomizaci ani kvalitu života. Pouze byla zachyceno zlepšení ejekční frakce levé komory o 2-5%, které sice bylo signifikantní statisticky, ale není a nemůže být signifikantní klinicky. Hodnocení této metaanalýzy uzavírá, že nejsou žádné podklady pro buněčnou léčbu infarktu myokardu mimo další klinické studie (**Fisher SA, 2016**). Pisatel práce zcela souhlasí s první částí věty o neexistenci podkladů a na rozdíl od některých autorit (**Wollert KC, 2015**) pochybuje o smysluplnosti dalších studií.

Naše studie léčby ischemické choroby dolních končetin (**Chochola M, 2008**) byla koncipována jednodušeji a tudíž se jí podařilo splnit zadání. Jak již bylo výše řečeno, ošetřili jsme 24 ischemických nohou, pozorovali jsme příznivý efekt na revaskularizaci, hojení chronických ischemických efektů i kvality života. Zdálo se, že prognóza co se týče lokálního stavu dolní končetiny či celkového přežití může být lepší než při použití standardní léčby (Autoři neuvedeni: **Management of peripheral arterial disease, 2000**).

Problém pochopitelně tkíví v tom, že nešlo o randomizovanou klinickou studii. Těch však není ve světě nedostatek, včetně studií od českých autorů (**Dubský M, 2013**). Dubský randomizoval 50 pacientů s tzv. diabetickou nohou (což je možno brát za jistou podskupinu ischemické choroby dolních končetin, i když se na jejím vzniku podílejí i další vlivy), z toho 17 pomocí BMMC, 11 pomocí PBPC a 22 pacientů sloužilo jako kontrolní skupina (standardní péče). Kromě zlepšení transkutánního tlaku kyslíku na periférii v kontrolní skupině (což byl parametr, jehož zlepšení jsme pozorovali i v naší studii), došlo i ke klinicky významnému výstupu, kdy se počet amputovaných nohou snížil z 50% u kontrolní skupiny na 11.1% u skupin léčených buněčnou terapií. Nebyly pozorovány vážné vedlejší účinky ani rozdíl mezi oběma buněčnými preparáty.

Ve srovnání se studii buněčné léčby akutního infarktu myokardu je randomizovaných studií léčby ischemické choroby dolních končetin pomocí BMMC ještě méně. I zde se zdá, že buněčná terapie zlepšuje funkční parametry, snižuje bolest, prodlužuje klaudikační interval a může mít pozitivní vliv na počet amputací. Pacienti s těžším postižením mohou z buněčné léčby profitovat více (**Liu FP, 2012**). Pokud se však zaměříme pouze na studie, které jsou kontrolovány placebem a jejich metaanalýzy, pak je přínos buněčné terapie méně jasný (**Teraa M, 2013; Moazzami K, 2014**). Navíc tyto studie byly malé a různé kvality. Uznávaná Cochranova databáze systemických přehledů (Cochran Database Systemic Reviews), která se vyznačuje vysokou metodologickou úrovní při zpracování metaanalýz, našla pouze dvě studie, které splňovaly kritéria alespoň průměrné kvality a dohromady v nich bylo zahrnuto jen 57

randomizovaných pacientů (**Peeters Weem SM, 2015**). Zde byla u pacientů léčených buněčnou terapií oproti kontrolní skupině zlepšena kontrola bolesti (vliv léčby na její zlepšení byl patrný i v naší nerandomizované studii), rovněž došlo ke zvýšení transkutánního tlaku kyslíku a prodloužení vzdálenosti, kterou pacienti ujdou dříve, než se objeví ischemické bolesti. Zejména byl však signifikantně významný rozdíl v amputacích (0% u skupiny léčené buněčnou léčbou v. 36% u kontrol,  $p = 0.007$ ). Uvedená studie uzavírá, že vzhledem k malému počtu nemocných není dostatek důkazů pro léčbu ischemické choroby dolních končetin mononukleárními buňkami, s čímž autor této práce souhlasí. Na rozdíl od buněčné léčby infarktu myokardu si však myslí, že zde je smysluplné pokračovat v dalších studiích, které ovšem budou dobře naplánovány a zorganizovány a zahrnou dostatečný počet pacientů.

## 6.2. Vývoj nového kultivačního postupu pro pěstování hMSC *in vitro* a vlastnosti vyvinutého produktu

### 6.2.1. Vývoj kultivačního postupu

Lidské i zvířecí MSC se tradičně kultivovaly a dosud kultivují s fetálním telecím sérem, kde ovšem jsou obavy z rizika přenosu zoonóz (zejména prionových nákaz) a zejména z imunizace pacientů vůči zvířecím bílkovinám, které pak způsobují odhojení hMSC při opakovaných aplikacích. Z těchto důvodů není použití fetálního telecího séra v současné době doporučováno (**EMEA/CHMP, 2008; EMA, 2011; EMA/CHMP/BWP, 2013**).

Tento názorový vývoj jsme do značné míry předjímali a snažili se vyvinout kultivační postup bez zvířecích bílkovin. To se nakonec podařilo a postup byl publikován v časopise *Biomaterials* v roce 2009 (**Pytlík R, 2009**) a dosáhl i patentové ochrany.

Zpočátku jsme se pokusili o prostou záměnu zvířecího séra za lidské. V lidském séru však hMSC rostly špatně a poměrně často podléhali spontánní tukové diferenciaci. Zkoušeli jsme i pupečnickové lidské sérum, ale hMSC, kromě pomalého růstu, měly i atypickou, senescentní morfologii (nepublikovaná data). Naše problémy s růstem hMSC v lidském séru jsou poněkud v rozporu s jinými pracemi, u kterých byly výsledky srovnatelné s FCS (**Le Blanc K, 2007**). Zkušenosti blízce spolupracujícího hradeckého pracoviště jsou však obdobné našim (**Suchánková Kleplová T, 2014**). Za zmínku stojí, že když jsme do média CellGro™ s 10% LS přidali dexamethason a askorbát, hMSC rostly, i když ne optimálně (**Stehlík D, 2010**).

Posléze jsme zkoumali možnosti suplementace lidského séra. Při této práci jsme vyšli z tehdy necelých deset let staré práce Gronthosa a Simmonse (**Gronthos S, 1995**), kteří ke kultivačnímu médiu s fetálním telecím sérem přidávali suplementy, a to dexamethason, askorbát, inzulin, EGF a PDGF-BB. Lidské MSC v suplementovaném médiu rostly podstatně lépe než v nesuplementovaném. Opět jsme se tedy pokusili zaměnit zvířecí sérum za lidské



a dodat jmenované suplementy, s relativně slušnými výsledky, které byly lepší než přidání 10% FCS. Druhého průlomu jsme dosáhli přidáním FGF-2 a (jak se tehdy zdálo) M-CSF (**Tsutsumi S, 2001; Jin-Xiang F, 2004**). Třetím průlomem bylo použití média CellGro™ for Hematopoietic Cells (výrobce CellGenix, Německo). Jde o patentované médium, jehož složení sice neznáme, ale má certifikát clinical grade kvality. K němu jsme přidávali 10% lidské sérum, 5 Gronthos-Simmonsových suplementů, FGF2 a M-CSF. Růst výtěžků hMSC spojených s úpravami kultivačního média je patrný na **Obr. 17**, uvedeném výše ve výsledcích. Posléze jsme došli k tomu, že M-CSF je postradatelné (**Stehlík D, 2012**) a tudíž jsme ho přestávali dávat beze ztráty výtěžků hMSC.

Co se týče jednotlivých užitých suplementů, dexamethason má velmi pleomorfní účinky na hMSC. V nízkých dávkách podporuje jejich růst, ve vyšších jej inhibuje a mění profil sekrece cytokinů. Buňky pěstované v médiu s dexamethasonem mají snížené schopnosti imunomodulace (**Wang H, 2012**). Dexamethason je ovšem také využíván pro osteogenní diferenciaci hMSC *in vitro*, kde může být potencován přidáním celé řady dalších suplementů (**Caterson EJ, 2002; Mostafa NZ, 2012**). Z uvedeného vyplývá že dexamethason by se neměl používat k suplementaci média, pokud mají být hMSC užity pro imunologické účely. V našich pracích jsme však imunosupresivní vlastnosti hMSC pěstovaných s dexamethasonem nestudovali, nemůžeme se tedy k tomu vyjádřit.

Askorbát rovněž podporuje růst hMSC a má pozitivní vliv na sekreci extracelulární matrix (**Choi KM, 2008**). Podpora proliferace askorbátem je patrně způsobena upregulací embryonálních transkripčních faktorů Oct4 a Sox 2 (**Potdar PD, 2010**). Podle některých prací askorbát nemá vliv na diferenciační schopnosti hMSC (**Choi KM, 2008**), podle jiných však podporuje adipogenezu (**Weiser B, 2009**). V našich pracích jsme žádné ovlivnění diferenciačních schopností hMSC nepozorovali. Za zmínku však stojí nutnost podat správnou formulaci askorbátu (tj. askorbát fosfát), protože v čistém askorbátu buňky rostou špatně. To mohlo být příčinou toho, že se jiným českým skupinám nepodařilo zopakovat naše výsledky (nepublikovaná data a osobní komunikace).

Inzulin a inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGFR-1) mají řadu účinků na MSC. První práce dokladující jeho vliv na buněčnou proliferaci u zvířat pochází z roku 1982 (**Balk SD, 1982**). Studie prováděné s inzulinem či IGFR dále prokázaly, že inzulin je schopen stimulovat MSC do osteoblastické linie (**Koch H, 2005**) a dokonce i směrem ke korneálním buňkám (**Trosan P, 2016**). V našich pracích byl inzulin relativně nedůležitý co se týče proliferace hMSC (viz též **Balk SD, 1985**), ovšem diferenciační schopnosti buněk kultivovaných s inzulinem či bez něj jsme nezkoumali.

Schopnost EGF stimulovat růst kuřecích embryonálních MSC byla prvně prokázána ve stejné práci, která prokázala pro-proliferativní vliv inzulinu (**Balk SD, 1982**). Dále bylo zjištěno, že kuřecí embryonální MSC transformované pomocí v-myc jsou hypersenzitivní k EGF, v-Ha-ras onkogen je naopak činil vůči efektu EGF rezistentními (**Balk SD, 1985**). Pokud spolu s EGF použije i PDGF, může být jejich efekt na MSC antagonistický (**Geng T, 2008**). V naší práci jsme tento antagonistický neprokázali - vynechání samotného EGF nemělo žádný

výrazný vliv na proliferaci hMSC, zatímco vynechání samotného PDGF-BB statisticky významně snižovalo výtěžky buněk i jejich koloniformní kapacitu (**Stehlík D, 2012**). EGF spolu s HGF má schopnost za určitých okolností diferencovat MSC do hepatocytů (**Tan Y, 2012**). Jinak je EGF věnována značná pozornost v souvislosti s takzvaným epitelově-mezenchymovým přechodem u nádorů (epithelial-mesenchymal transition, EMT), což je zjednodušeně řečeno posun nádorových buněk k malignějšímu fenotypu (**Liu ZC, 2014**). Tento přechod může být mediován různými cestami, které se však patrně scházejí u proteinu Snail (**Liu ZC, 2014; Kim J, 2016**). Význam tohoto jevu pro eventuální sklon k maligní transformaci hMSC nebyl dosud zkoumán, patrně však nebude významný, protože nádorové buňky vlivem EGF mění fenotyp, nikoli genotyp.

Destičkové růstové faktory (PDGF), které mají různé izoformy (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-C a PDGF-D) mají pleotropní účinky na MSC. Nejčastěji je používána izoforma PDGF-BB, kterou jsme použili i my v našich pracích. Proliferační vliv PDGF-BB na MSC byl prokázán již více než před 20 lety (**Casiede P, 1996**), PDGF-BB však nestimulovalo osteochondrogenezu *in vitro* ani *in vivo*. Podobný účinek (dobrá proliferace, ale špatná tvorba kosti *in vivo*) byl prokázán i v dalších pracích a byl přičten působení receptoru PDGFR-beta. Jeho zablokování vedlo ke zvýšené osteochondrální diferenciaci, zatímco blokáda receptoru PDGFR-alfa měla minimální účinek (**Tokunaga A, 2008**). Proproliferační účinky PDGF-BB byly ukázány též v práci **Ng F, 2008**, kde buňky stimulované pomocí TGF-beta, PDGF-BB a EGF bylo možno kultivovat v bezsérových podmínkách až po dobu pěti pasáží. PDGF-BB má pozitivní vliv na MSC i co se týče jejich migrace (do poraněných orgánů, bohužel však i do tumorů), která je zprostředkována expresí metaloproteáz (**Sun X, 2013**).

Signalizace prostřednictvím PDGF receptorů může podobně jako EGF spouštět epiteliálně-mezenchymový přechod (**Smith CL, 2011**). Stejné signální dráhy mohou u MSC od pacientů s chronickou lymfatickou leukémií stimulovat tvorbu vaskulárních růstových faktorů a přispět k vaskularizaci a rychlejší progresi nádoru (**Ding W, 2010**).

V našich pracech jsme pozorovali povšechně příznivý vliv PDGF-BB na naše buňky. Po vynechání PDGF-BB z cytokinového koktejlu významně klesly jak výtěžky, tak koloniformní aktivita MSC (**Stehlík D, 2012**). Pozorovali jsme jistý sklon hMSC kultivovaných s PDGF-BB k diferenciaci do adipogenní linie, ale blíže jsme tento účinek nezkoumali (nepublikovaná data).

Efekt FGF-2 (někdy též zastarale bFGF, basic fibroblast growth factor) na mezenchymové stromální buňky je všeobecně oceňován a chválen. Jeho proliferativní efekt byl rovněž popsán prvně v 80. letech minulého století (**Albert P, 1987**). FGF-2 pomáhá i v průběhu proliferace zachovat kmenové vlastnosti hMSC (**Tsutsumi S, 2001**), na rozdíl od PDGF-BB pomáhá též jejich chondrogenní a osteogenní diferenciaci (**Solchaga LA, 2005; Maegawa N, 2007**). FGF-2 oddaluje buněčnou senescenci (**Coutu DL, 2011**) a chrání hMSC před účinky hypoxie (**Song H, 2005**). V našich pracech FGF-2 výrazně zvýšil výtěžky hMSC, pokud byl přidán k pěti Gronthos-Simmonsových suplementů (viz výsledky, **Obr. 17**). Naopak, byl-li vysazován z výsledné formule,

konzistentně způsoboval pokles výtěžku hMSC o 50% a koloniformní kapacitu o třetinu ( $p = 0.03$ ,  $p = 0.003$ , **Stehlík D, 2012**). Ostatní účinky FGF-2 na hMSC pěstovaných v našich kultivačních podmínkách zkoumány nebyly.

M-CSF je v souvislosti s mezenchymovými stromálními buňkami zmiňován spíše jako cytokin, který je jimi secernován a vytváří prostředí pro vývoj hematopoetických buněk a osteoklastů (**Haynesworth SE, 1996; Majumdar MK, 1998; Sharaf-Eldin WE, 2016**). V souvislosti se stimulací růstu hMSC se mu kromě našich prací věnuje jen práce Jin-Xiangova (**Jin-Xiang F, 2004**). U nás jeho přidání k šesti růstových faktorů (Gronthos-Simmons + FGF-2) výrazně zlepšilo proliferaci hMSC v prvních experimentech (viz výsledky, **Obr. 17**). Avšak při jeho opětovném vynechání z výsledné formule jsme nepozorovali žádný rozdíl v celkovém výtěžku buněk, i když počet CFU-F byl statisticky signifikantně nižší (**Stehlík et al, 2012**). V dalších nepublikovaných experimentech jsme potvrdili jeho relativní zbytnost, čímž došlo k nezanedbatelné úspoře, protože M-CSF byl z našeho cytokinového koktejlu nejdražší a jako jediný nebyl dostupný v GMP kvalitě. Jinak se nám podařilo všechny suplementy získat v GMP kvalitě, výtěžky buněk byly podobné jako s research grade suplementy (nepublikovaná data).

Naše kokultivace hMSC a krvetvorných buněk bez odmytí média je naprosto unikátní. Co se týče kokultivačních experimentů, existují práce, které dokazují, že společná kultivace zvyšuje výtěžky MSC (**Baksh D, 2003; Baksh D, 2005**), což se nám podařilo prokázat též (**Pytlík R, 2009**). Ale největší výhodou uvedeného postupu je to, že s buněčnými kulturami se za celé dva týdny jejich kultivace nemanipuluje, pouze se přidávají suplementy. Při velmi rychlém růstu hMSC u některých jedinců dochází k acidifikaci média, což je možno velmi pohodlně zjistit změnou zbarvení média a kultury je možno ukončit dříve (nepublikovaná data).

Náš způsob přípravy buněk s velkým množstvím cytokinů a speciálním růstovým médiem je bohužel velmi drahý. Ve světě byly tedy zkoumány i další metody kultivace hMSC bez zvířecího séra. Bylo zjištěno, že buňky lze sice pěstovat v bezsérovém médiu, ale opět za pomoci drahých suplementů, jejichž některé kombinace byly publikovány (**Ng F, 2008**), většina však nikoli.

Cesta za kultivačním médiem bez xenogenních proteinů se v současné době ubírá cestou plazmy bohaté na destičky (PRP). Z ní je možno vytvořit buď destičkový lyzát (HPL) opakovaným zamražením na  $-80^{\circ}\text{C}$  a rozmražením na teplotu  $37^{\circ}\text{C}$  nebo plazmu obohacenou o faktory uvolněné z aktivovaných destiček (platelet releasate in plasma, zkratka rovněž PRP - **Bieback K, 2009**). Destičky lze aktivovat různými způsoby. Zatímco při aktivaci trombinem vzniklý produkt podporuje růst destiček méně než HPL, při aktivaci  $\text{CaCl}_2$  je tomu naopak. Každopádně v kterémkoli přípravku vyrobeném z PRP rostou hMSC lépe než v médiu suplementovaném FBS (**Bieback K, 2009; Bernardi M, 2017**). Plazma obohacená o destičkové faktory obsahuje oproti lidskému séru zvýšené množství bFGF, GITR, IGFBP-3, s latencí asociovaný peptid TGFbeta, MIF, MIP-1b, MSP-a, RANTES, VEGF a všechny různé izoformy PDGF (AA, AB, BB - **Bieback K, 2009**). Destičky připravované s různými deriváty PRP se v současné době

vyrábějí podle správné výrobní praxe (GMP - **Bieback K, 2013**) a jsou použitelné ke klinickým studiím (**Lucchini G, 2010**). Srovnání našeho kultivačního postupu s médiem obohaceným o PRP deriváty nebylo provedeno, ale počítáme s tím v budoucím výzkumu.

## 6.2.2. Vlastnosti hMSC kultivovaných v médiu CellGro™ s lidským sérem a suplementy

### 6.2.2.1. Splnění základních kritérií pro MSC.

Dle definice Dominici a LeBlanc (**Dominici M, 2006**) musí hMSC splňovat následující imunofenotypická kritéria: pozitivita na CD73, CD90, CD105 a negativita na znaky krvetvorných řad (v definici jmenovitě uvedeny CD14, CD34, CD45 a na HLA-DR. MSC však exprimují i jiné znaky než jsou výše uvedené, jmenovitě např. CD10, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD44, CD49a-e, CD63, CD71, CD106, CD117, CD146 nebo CD166, tento seznam zdaleka není vyčerpávající. Na druhou stranu, koktejly protilátek proti buňkám krvetvorných řad mohou obsahovat navíc např. CD3, CD16 a CD19.

To, že hMSC připravené naším způsobem kultivace splňují minimální fenotypická kritéria MSC, jsme prokázali v pracích **Pytlík R, 2009** a **Pytlík R, 2017**. Lidské MSC vytvořené naším způsobem lnuly k plastu, neadherentní buňky byly před imunofenotypizací odmyty. V době, kdy jsme připravovali publikaci **Pytlík R, 2009**, nebyla běžně k dispozici protilátka proti CD73, ovšem CD90 a CD105 byly použity a byly použity rovněž protilátky proti dalším znakům exprimovaným na hMSC (CD29, CD44, CD49a, b, d, e, CD106, CD166). Hematopoetické znaky byly negativní, s výjimkou přimísených zbytkových krvetvorných buněk. Ty však byly přimíseny i v buňkách kultivovaných s FCS, zejména šlo o makrofágy (viz též **Tab. 9** ve výsledcích výše). Je zajímavé, že naše buňky (s výjimkou statisticky nesignifikantně nižší expresí CD166) vesměs exprimovaly znaky MSC více, než buňky pěstované ve FCS. Zvláště zajímavé je to u CD106 (13% v. 3.7% ve FCS,  $p < 0.05$ ), protože buňky s tímto znakem mají unikátní imunomodulační schopnosti (**Yang ZX, 2013**). Je tedy hypoteticky možné, že naším postupem připravené hMSC by nemusely mít snížené imunosupresivní schopnosti oproti buňkám pěstovaným ve FCS, a to navzdory užití dexamethasonu.

Přítomnost CD73 na hMSC pak byla zkoumána v práci **Pytlík R, 2017**, kde opět hMSC kultivované naším způsobem tento marker exprimovaly. Počet trojitě pozitivních (CD73+CD90+CD105+) buněk je vysvětlitelný vyšší autofluorescencí hMSC kultivovaných v CellGro™ s LS a S oproti hMSC kultivovaným s FCS, což znemožňuje nastavení přesných kompenzací.

Trilineární diferenciací potenciál byl plně prokázán v práci **Pytlík R, 2009**, viz též **Obr. 21 a 24** výše ve výsledcích). Zde se zdálo, že hMSC kultivované naším způsobem mají lepší diferenciací potenciál směrem k osteogenní linii než hMSC kultivované s FCS, ale toto nebylo dostatečně

kvantitativně prokázáno. K tomuto tvrzení však máme další podpůrné doklady: profily genové exprese (viz následující kapitola), vyšší frekvence BMP-2+ALP+ buněk osteokalcin negativních (tj. proliferujících –*Tsuji K, 2006; Yu YY, 2010; Stehlík D, 2012*), a konečně lepší proliferaci a lepší tvorbu mineralizované matrix v pokusných zvířatech (*Pytlík R, 2009*). Je ovšem nutno pamatovat na to, že již v úvodu bylo uvedeno, že diferenciační schopnosti *in vitro* nemusí mít přímý vliv na performanci hMSC *in vivo*.

Souhrnem lze tedy říci že hMSC kultivované v CellGro™ s 10% lidským sérem, dexamethasonem, askorbátem, inzulinem, EGF, PDGF-BB, FGF-2 a M-CSF splňují kritéria pro mezenchymové stromální buňky, přičemž patrně mohou pohotověji diferencovat do osteogenní linie než hMSC kultivované v alfa-MEM s fetálním telecím sérem.

### 6.2.2.2. Profily genové exprese

Tuto práci se nepodařilo zcela dotáhnout do konce, protože se nepodařilo ověřit výsledky získané na mikročipech Illumina verifikovat rt-PCR, patrně vzhledem k ztrátě kvality vzorků RNA (viz výše). Z tohoto důvodu máme k této otázce pouze nepublikovaná data, která navíc, vzhledem k tomu, že nedošlo k jejich verifikaci nezávislými metodami (kromě rt-PCR např. Western blot), mají jen omezený význam.

V krátkosti, při srovnání hMSC kultivovaných v CellGro™ s LS a S s hMSC kultivovaných v alfa-MEM s FCS, bylo zjištěno 134 diferenciaálně exprimovaných genů (65 overexprimovaných v médiu CellGro™ s LS a S a 69 v médiu alfa-MEM + FCS). Tyto geny se podařilo seskupit do několika klastrů, přičemž pro nás měly význam zejména klastry pro osifikaci, kosterní vývoj a kostní diferenciaci. Zde jsme zjistili celkem šest diferenciaálně exprimovaných genů, jmenovitě CDH11, CTSK, COL1A1, CTGF IGFBP3, a ARID5B (viz též **Tab. 13** ve výsledcích). Vzhledem k tomu, že o vývoj kostí nám šlo v první řadě, budeme zde diskutovat pouze těchto šest genů.

**CDH11 (cadherin 11, někdy též OB cadherin)** má vliv na buněčnou adhezi (*Marie PJ, 2014*) a kosterní vývoj (zejména u dětí, *Di Benedetto A, 2010*), a to signální drahou Wnt/beta-catenin (*Marie PJ, 2014*). Dále též snižuje schopnost diferenciace MSC do myofibroblastů (*Wang H, 2014*). **COL1A1 (kolagen typ I nebo alfa-1)** je rovněž důležitý pro vývoj kostry, mutace v tomto genu způsobuje těžkou osteogenesis imperfecta (*Bardai G, 2016*). Toto onemocnění, jak jsme již několikrát uvedli, může být léčeno alogenní transplantací kostní dřeně. V kosterním svalstvu naopak hraje negativní roli, protože způsobuje fibrózu muskulatury při poranění nebo u pacientů s Duchénovou muskulární dystofií (*Ieronimakis N, 2016*). **Reportér genu pro CTGF** (connective tissue growth factor) identifikuje subpopulaci MSC, která je přítomna v oblasti trabekulární kosti (*Wang W, 2015*). Vazba osteoblastů na CTGF zprostředkovaná pomocí integrinů způsobuje reorganizaci jejich cytoskeletonu a další diferenciaci (*Hendesi H, 2015*). CTGF má rovněž pozitivní vliv na diferenciaci MSC do šlachových buněk (*Yin Z, 2016*). Na druhou stranu, zvýšená exprese CTGF tvoří příznivé prostředí pro kostní metastázy karcinomu

prsu a neuroendokrinních tumorů a je povšechně spojeno se špatnou prognózou zhoubných nádorů (*Wells JE, 2015; Cives M, 2016; Sasaki S, 2016*). **IGFBP3 (insuline-like growth factor binding protein 3)** má nejasnou úlohu v osteogenní diferenciaci MSC. V jedné práci bylo prokázáno, že IGFBP3 osteogenezu stimuluje (*Lee J, 2010*), v jiné naopak, že je overexprimován v nepřítomnosti androgenní signalizace, čímž inhibuje osteogenezu a zvyšuje adipogenní potenciál hMSC (*Huang CK, 2013*). Zvýšená hladina IGFBP3 údajně zodpovídá za poškozenou mineralizaci a osteogenní diferenciaci hMSC, které jsou navozené hypoxií (*Kim JH, 2016*). Každopádně, úloha tohoto genu v osteogeneze není zcela vyjasněna. **ARID5B (AT bohatá interaktivní doména 5B, též MRP-2, modulačně regulatorní protein)** je gen regulující SWI/SNF remodelaci chromatinu (*Cancer Genome Atlas Research Network, 2013*). Podílí se na podpoře chondrogenyzy a reguluje triglyceridový mechanismus v adipocytech (*Yamakawa T, 2010; Hata K, 2013*). Nicméně jeho úloha v osteogeneze patrně nebude velká a je zmiňován především v souvislosti s náchylností k nádorovým a autoimunním chorobám. Polymorfismy ARID5B zvyšují riziko akutní lymfoblastové leukémie u dětí, ale i revmatoidní artritidy, lupus erytematosus a dokonce aterosklerózy (*Wang G, 2008; Yang W, 2010; Okada Y, 2012; Yang W, 2013*).

Uvedené geny se spíše pozitivním efektem na skeletární vývoj byly diferenciaci overexprimovány v hMSC kultivovaných ve CellGro™ s LS a S. Jejich overexprese je ovšem spojena s jistými riziky - fibrózy jiných orgánů při migraci buněk, adipogenní diferenciaci v určitých podmínkách nebo podporu metastatického potenciálu dosud nediodagnostikovaných nádorů.

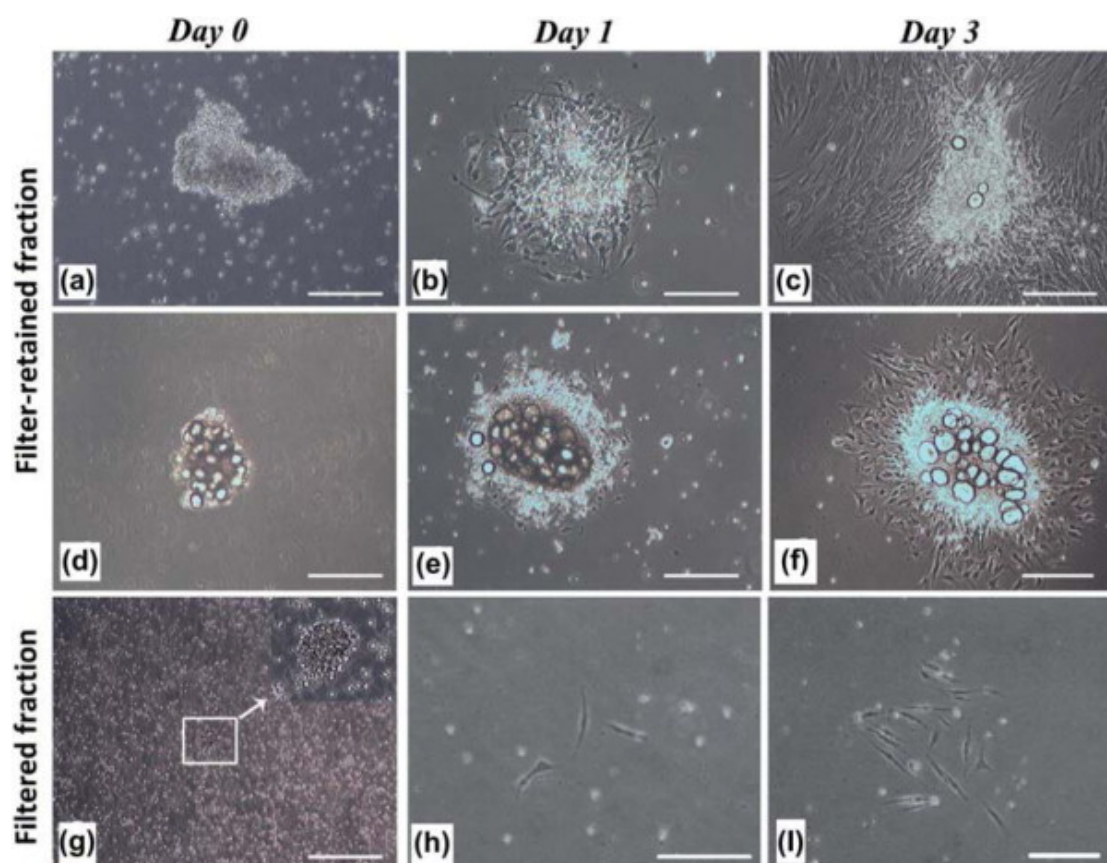
Jediným genem sdružený s osteogeneze, skeletárním vývojem a osifikací, který byl diferenciaci zvýšeně exprimován v hMSC kultivovaných v alfa-MSC, je **CTSK (kathepsin K)**. Tento gen stimuluje osteolýzu a osteoklastogenezu prostřednictvím signální dráhy NFkappaB (*Veronesi F, 2017*). Toto by mohlo signalizovat, že hMSC kultivované v CellGro™ s LS a S nebudou tolik stimulovat kostní resorpci. Jde ovšem o relativní výhodu, protože kostní přestavba se bez resorpce neobejde.

### 6.2.2.3. Podpora krvetvorby lidskými MSC

Podporou krvetvorby jsme se nakonec zabývali pouze okrajově. Podařilo se nám popsat časně nálezy společných kolonií hMSC, hematopoetických a tukových buněk, které pokládáme za funkční niche, které se podařilo uchovat v průběhu zpracování kostní krve (**Obr. 29**). Pracovně jsme je nazvali MSC-HC kolonie. Rovněž jsme pozorovali, že jejich složení závisí na použitém médiu (erytroidní buňky rostly pouze v CellGro™ s LS a S). Podobné kolonie byly publikovány v článku *Ahmadbegdi N, 2012*. Zde autoři přefiltrovali zbytkové BMSC z odběrových vaků před buněčné filtry. Ve frakci, která zůstala na filtru, byly zachyceny výše zmíněné agregáty buněk, ve frakci, která filtrem prošla, pak již nikoli (**Obr. 41**). Ahmadbegdi se však nezajímal o vztahy hMSC s krvetvornými buňkami, ale šlo mu o co neúčinnější izolační protokol pro hMSC. V naší práci jsme tato pozorování nerozvinuli především proto, že MSC-HC kolonie byly pozorovány pouze nepravidelně a v malém množství kultivačních

nádobek. Přefiltrování BMSC přes buněčné filtry a použití zachycených agregátů buněk je technika, kterou je možno zvýšit počet MSC-HC kolonií v kulturačních nádobách a stringentněji je zkoumat.

Obr. 41 – *Ahmadbegdi N, 2012*. a-f: buněčné shluky nalézané ve frakci zachycené na buněčném filtru, g-i: kultury z buněk, které prošly filtrem.



#### 6.2.2.4. Kryoprezervace

Kryoprezervace hMSC urazila dlouhou cestu od doby, kdy se jako mrazící médium používala směs kulturačního média a FCS (*Reger RL, 2008*). Vzhledem k riziku imunizace člověka zvířecími bílkovinami, která může způsobovat odhojení hMSC při opakovaném podání (*Sundin M, 2007*) šel vývoj dvojím směrem: za prvé, náhradou FCS lidským sérem, plazmou či destičkovým lyzátem (*Dulgiac M, 2015; Mitchell A, 2015; Escobar CH, 2016*), za druhé, snahou o vývoj bezsérového média. Pollockovi (*Pollock K, 2016*) se podařilo pomocí vývojového algoritmu nalézt jako nejvhodnější roztok pro zamrazování MSC 300 mM etylenglykol, 1 mM taurin a 1% ectoin. Jiná práce použila neuropeptidy z rodiny vazoaktivního intestinálního peptidu/glukóza-depententního inzulinotropního peptidu/pituitární adenylát cyklázy aktivačního polypeptidu (*Briquet A, 2013*). Ray et al. použil s úspěchem samotný fyziologický roztok s polyvinylpyrrolidonem (*Ray SS, 2016*).

Pochopitelně, celá řada bezsérových médií byla vyvinuta komerčně. Sem patří například např. STEM-CELLBANKER™ (Zenoaq, Tokio, Japan), MSC



Freezing Solution (Biological Industries, Cromwell, CT, USA) nebo StemXVivo® Serum-Free MSC Freezing Media (R&D Systems, Mc Kinley Place NE, MN, USA). Výsledky s těmito médii byly publikovány v řadě důvěryhodných časopisů (*Al-Saqi SH, 2015; Shimazu T, 2015*).

V našich pracech se podařilo prokázat, že použití samotného kultivačního média (ať již alfa-MEM nebo CellGro™) s 10% DMSO má stejně dobré výsledky jako tatáž média kombinovaná s FCS či LS (**Tab 15-17**). Použití MSC Freezing Solution (Biological Industries) nebylo o nic lepší než kterékoli z našich "domácích" médií. Bohužel se nám nepodařilo prokázat příznivý vliv sericinu na zamražení hMSC, i když se zdá, že při použití sericinu by bylo možno snížit koncentraci hMSC z 10% na 5% (*Verdánová M, 2014*).

Za největší přínos našich kryoprezervačních experimentů pokládáme zavedení CFU-F eseje do hodnocení klonogenní kapacity hMSC po rozmražení. Zatímco při použití klasických způsobů zjišťování viability (trypanová modř aj.) jsou v naší práci i v jiných pracech mezi hMSC před zamražením a po něm jen nesignifikantní rozdíly, tvorba kolonií byla u buněk kultivovaných v alfa-MEM s FCS snížena zamražením zhruba o třetinu a u buněk kultivovaných v CellGro™ + LS + S o polovinu (menší koloniformní kapacitu buněk kultivovaných v CellGro™+ LS + S oproti hMSC kultivovaným v alfa-MEM s FCS jsme prokázali již dříve – viz *Pytlík R, 2009*). Srovnání koloniformní kapacity hMSC před a po zamražení není ve světě běžně užíváno, ale z našich experimentů vyplývá, že by mohlo být lepším funkčním testem než prosté hodnocení trypanovou modří nebo pomocí imunofluorescence.

## 6.3. Bezpečnost a účinnost vyvinutého produktu

Bezpečnost a preklinická účinnost každého buněčného produktu je nezbytná pro jeho schválení pro klinické experimenty. Z tohoto důvodu jsme věnovali těmto otázkám velkou pozornost, i když nešlo vždy o data, která by byla publikovatelná.

### 6.3.1. Cytogenetická stabilita

V naší práci jsme zjistili chromozomální abnormality, včetně abnormalit klonálních, v hMSC kultivovaných v CellGro™ s lidským sérem a suplementy. Toto zjištění jsme pokládali za závažné, vzhledem k tomu, že jde o nový kultivační postup a že buňky měly být užity v klinických studiích. To nakonec vedlo k pozastavení žádosti o provedení klinické studie hMSC. I kdybychom každou šarži hMSC kultivovaných naším postupem cytogeneticky vyšetřovali, vedlo by to k vyřazení řady šarží a k problémům se zdárným dokončením klinické studie. Navíc, cytogenetické vyšetření metodikou mFISH je velmi drahé. Lidské MSC kultivované nově vyvinutým způsobem sice nepůsobily nádory v imunodeficientních zvířatech, avšak zde je nutno počítat s reziduální imunitou pokusných zvířat proti xenogenním MSC a s možností jejich odhojení.

Jak je to tedy s klinickou signifikancí námi zjištěných abnormalit? Obecně platí, že nestabilita karyotypu v buněčných liniích je známým fenoménem a to i v liniích vycházejících ze zdravých buněk (**Ferreira RJ, 2012; Jacobs K, 2014**). V průběhu *in vitro* kultivací může dojít k tzv "kultivačním artefaktům," tj. ke vzhledu nahodilých chromozomálních aberací. Tyto buňky většinou nejsou životaschopné a mohou vymizet. Během další kultivace může ale také dojít ke klonální selekci takových buněk.

V uplynulých letech bylo publikováno několik sdělení o "maligní transformaci" hMSC *in vitro* (**Rubio D, 2005**), následné práce však toto hodnotily velmi skepticky (**Bernardo ME, 2007**) a v některých pozorovaných případech vskutku šlo o kontaminaci souběžně kultivovanou nádorovou linií. Každopádně pokud k maligní transformaci hMSC od zdravých dárců *in vitro* dochází, jde o jev neobyčejně vzácný. Je známo, že u pacientů s myeloidními malignitami (akutní myeloidní leukémie, myelodysplastický syndrom) jsou v hMSC pozorovány chromozomální abnormality jiné než v leukemickém klonu, ale jejich význam je zcela nejasný (**Blau O, 2011**). Každopádně jednou vyléčení pacienti s akutní leukémií neumírají na osteosarkomy či jiné tumory pocházející z hMSC. Dle našich znalostí je u zdravých dárců hMSC abnormální karyotyp vzácný (1 z 59 pacientů ze studie **Muntion S, 2012**), u pacientů s lymfoidními malignitami žádná taková práce publikována dosud nebyla.

Vysvětlení odlišnosti našich výsledků od dřívějších cytogenetických studií u hMSC od zdravých dárců může být rychlost kultivace, při které buňky s abnormálním karyotypem vznikají s větší pravděpodobností. Dále z citované práce (**Jacobs K, 2014**) vyplývá, že některé chromozomální abnormality nemusí být konvenční cytogenetikou vůbec postižitelné a je tudíž možné, že jejich skutečný počet je podceňován.

Jak již zmíněno v úvodu, karyotypické abnormality hMSC jsou většinou spojené s buněčnou senescencí (**Romanov SR, 2001; Estrada JC, 2013**). Takové buňky sice netransformují, ale senescentní hMSC mají poškozené diferenciační i imunomodulační schopnosti, nemluvě o schopnostech další proliferace *in vivo*. Námi vyvinuté buňky sice dále proliferovaly, ovšem pouze v alfa-MEM s FCS a při pasážování v CellGro™ s LS a S jsme se dostali nejdále ke druhé pasáži (nepublikovaná data). Na druhou stranu, jejich diferenciační vlastnosti se nezdály být postiženy. Každopádně, je nutné provést další studie se zaměřením na senescenci a také na schopnost imunomodulace hMSC kultivovaných v GellGro™ s lidským sérem a suplementy. Vhodné by bylo i pokusit se o zjištění dalšího osudu hMSC s karyotypovými abnormalitami, obáváme se však, že to bude technicky velmi náročné.

### 6.3.2. Testování bezpečnosti a účinnosti na imunodeficientních zvířatech

Testování bezpečnosti a účinnosti lidských buněk na zvířatech je neobyčejně obtížné. Imunokompetentní jedinci, jak již bylo několikrát zmíněno výše, xenogenní buňky odhrají. Co se týče imunodeficientních zvířat, je nutno

mít na mysli, že existují pouze modely "malých" zvířat (myši, potkanů) a jediným obecně uznávaným modelem "velkého" zvířete je fetální ovce (**Mackenzie TC, 2001**). Zde by mohla být naopak problémem reakce imunodeficientního jedince na podané buňky, obzvláště na buňky imunitního systému (**Berney T, 2001**). MSC jsou pokládány za buňky "privilegované" a imunologicky tolerované, i zde však k dochází k rejekcím xenotransplantátu v důsledku reziduální imunity, jak již také vícekrát zmíněno v předchozích oddílech (**Grinnemo KH, 2004**). Vzhledem k tomu, že buněčná terapie je poměrně mladý obor, nebyly tyto problémy zatím uspokojivě vyřešeny.

V našich studiích bezpečnosti a účinnosti jsme používali nejprve NOD/LtSz-Rag1null/null myši (**Pytlík R, 2009**) a posléze NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J myši (nepublikovaná data, viz Výsledky výše). Na prvním modelu jsme prokázali, že hMSC kultivované v CellGro™ + LS + S, které byly posléze nasazeny na polylaktidový scaffold a kultivovány v osteogenním diferenciačním médiu, jsou schopné další proliferace *in vivo* a tvoří fibrózní kost. V tomto ohledu byly lepší než hMSC kultivované v alfa-MEM s FCS. Použili jsme heterotopický model, implantáty byly podávány podkožně. NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J myši byly v dalších experimentech použity proto, že mají ještě menší reziduální imunitu než výše zmíněný kmen. Lidské MSC jsme podávali rovněž podkožně (vzhledem k precedentu studie **Pytlík R, 2009**), a to buď v plazmatické sraženině nebo na preparátu Cem-Ostetic®. Podávání v plazmatické sraženině bylo zvoleno proto, že jsme předpokládali, že tato bude proteolytickými mechanismy rozpuštěna a buňky budou moci migrovat do ostatních orgánů, aniž by se přednostně zachycovaly v plicích. Tento předpoklad však byl patrně pouhou hypotézou, po dvou týdnech se až na jedinou výjimku nepodařilo prokázat v parenchymatózních orgánech žádné lidské buňky. Buňky nasazené na preparátu Cem-Ostetic® proliferovaly a vytvářely kostěnou strukturu, ovšem otázka jejich migrace nebyla uspokojivě zodpovězena, též vzhledem k našim technickým omezením. Lidské buňky neměly žádný vliv na krevní obraz ani nezpůsobovaly jakákoli orgánová poškození. Je ovšem nutno přiznat, že tyto pokusy nebyly provedeny dle lékopisu v certifikovaném zařízení a mají tudíž jen omezenou platnost.

Co se týče agresivity myši po podání lidských hMSC, nemáme pro to žádné vysvětlení, v literatuře nic podobného popsáno nebylo. Nicméně NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J myši jsou samy o sobě agresivní typ a zvýšení agresivity mohlo být způsobeno nspecificky, samotným faktem operace a následného lokálního dráždění, koneckonců mohlo jít i o chybu malých čísel. Po přepočtu vržených mlád'at na dobu přežívání párů nebyl pozorován žádný významný rozdíl u myši, u nichž byly použity hMSC a u myši, u nichž použity nebyly. Tento jev tedy patrně z hlediska bezpečnosti hMSC kultivovaných v CellGro™ s LS a S není významný.

K preklinické studii účinnosti v ortopedické regenerativní medicíně byli použiti athymičtí rnu-rnu potkani (**Pytlík R, 2017**). Zařízení 1. lékařské fakulty nemělo licenci k užití těchto zvířat a navíc zde chybělo operační zázemí, tudíž tyto studie byly provedeny v Drážďanech, za osobní spoluúčasti autora této práce. Byl použit jeden z běžných kritických kostních arteficiálních defektů, totiž

segmentární femorální defekt (**Cuomo AV, 2009**). Ten pokládáme za klinicky relevantnější než druhý model, kterým je defekt kalvariální (**Yoon E, 2007**). Úmyslně jsme použili samotné buňky bez nosiče (scaffoldu), protože žádnou podobnou studii jsme nenašli a bylo velmi lákavé zjistit, zda hMSC fungují i samy. Buňky byly implantované v plazmatické sraženině, která se rychle rozpouští proteolytickými mechanismy a není ji tudíž možno pokládat za nosič. Šlo o randomizovanou studii, kde kontrolní skupinu tvořili potkani, jimž byla implantována pouze plazmatická sraženina. Pochopitelně v lidských aplikacích nebudou moci být buňky bez nosiče použity k léčbě kritického segmentálního defektu, který by u člověka byl dlouhý zhruba deset centimetrů, ale mohou být použity k různým osteosyntézám, ke zlepšení hojení osteotomií či špatně srůstajících fraktur.

K provedení této studie jsme měli dobré precedenty v dřívějších pracích, kde přidání hMSC ke scaffoldům mělo konzistentně lepší výsledky než použití scaffoldů samotných. V modelu kalvariálního potkaního defektu to byla například zmíněná práce **Yoon E, 2007**, kde byly použity nediferencované nebo *in vitro* osteogenně prediferencované hMSC na scaffoldu vytvořeném z polylaktidu a polyglykosidu. Po dvou týdnech měly prediferencované buňky nejlepší výsledky, ale zhojilo se pouze 35-72% plochy defektu. **Chen W, 2013** použil hMSC z kostní dřevě a pupečnickové krve spolu s kalciofosfátovým nosičem. Oboje buňky zlepšovaly kostní hojení, ale ani po 24 týdnech nepokryvala nově vytvořená kost více než 35% defektu. **Suenaga H, 2015** použil ve své studii tzv. hMSC sféroidy (trojrozměrné shluky hMSC), které byly použity rovněž s minerálním nosičem. I ony přispěly k hojení kosti sice signifikantně, ale k celkovému zhojení defektů nedošlo.

V kritickém femorálním defektu (5-6 mm) stabilizovaném interní fixací vidíme fyziologicky relevantnější model, protože nově tvořená kost je tam zatížena. Již dvakrát zmíněný Cuomo zjistil, že kostní krev obohacená o hMSC nasazená na demineralizovanou kostní tkáň nemá lepší výsledky než samotná demineralizovaná kost a lepší je přidání rekombinantního kostního morfogenetického proteinu BMP-2, který zahojil 9 z 10 defektů. **Liu G, 2010** ukázal, že lidské MSC z umbilikální krve v kombinaci s částečně demineralizovanou kostní hmotou může zcela zhojit femorální kostní defekt. Na druhé straně zcela selhaly hMSC z tukové tkáně nasazené na kolagenně-keramický nosič (**Peterson B, 2005**). Aby tyto buňky fungovaly, musely být rovněž transfekované konstitutivně exprimovaným genem pro BMP-2.

Celkově byla data, z nichž jsme vycházeli, velmi heterogenní a jediné, čím v čem se shodovaly, bylo použití nosiče pro hMSC. Na podkladě uvedených výsledků jsme rovněž neočekávali kompletní zhojení kostního defektu. Vzhledem k tomu, že jsme prokázali, že buňky vypěstované v CellGro™ s lidským sérem a suplementy produkovaly více mineralizované tkáně než buňky pěstované v alfa-MEM s fetálním telecím sérem, nepokládali jsme za nutné užít hMSC kultivované tímto klasickým způsobem jako další kontrolu vedle samotné plazmatické sraženiny.

Výsledky byly překvapivé. To, že jsme v osmi týdnech pozorovali lepší hojení defektů s implantovanými buňkami od zdravých dárců (ne od pacientů s lymfomy, přestože jejich kostní dřeň byla ve většině případů onkologicky negativní), překvapivé nebylo. Lidské MSC vykultivované z kostní dřevě u pacientů s hematologickými malignitami mohou mít odlišné funkční charakteristiky než buňky od zdravých dárců, aniž mají chromozomální abnormality (**Fei C, 2014**). Pacienti s lymfomy byli též starší než zdraví dárce a vliv hMSC na hojení kostí může klesat s věkem (**Stenderup K, 2003**). Naše kohorta ovšem byla příliš malá na to, aby se daly smysluplně počítat interakce mezi dárcovským statutem a věkem.

Překvapivé ovšem bylo to, že po osmi týdnech se přírůstek nové kosti zastavil jak v experimentální, tak kontrolní skupině. V experimentální skupině ovšem v reziduální vazivové tkáni pokračovala vaskulogeneza lépe, než ve skupině kontrolní. Mohlo jít tedy o to, že v důsledku remodelace tkáně se zastavil přírůstek kosti až do doby, než bylo vytvořeno dostatečné množství nových cév a tudíž náš experiment (přestože jeden z nejdelších publikovaných) byl nakonec příliš krátký.

Lidské MSC přetrvávaly v defektech po celých šestnácti týdnech experimentu, jak bylo prokázáno imunohistochemicky a imunofluorescencí. Bohužel však z technických důvodů (řezy na sklíčka nebyla drážďanskými kolegy dobře připravena) nebylo možno buňky kvantifikovat (materiál se při imunohistochemickém či imunofluorescenčním barvení trhal a odplouval). Lidské buňky byly rovněž přítomny pouze v reziduálním vazivu, nikoli v novotvořené kosti. Toto dokazuje, že hMSC v tomto modelu především produkovaly imunomodulační, proliferační a migrační faktory.

Implantace hMSC do defektu byla bezpečná. Lidské buňky nebyly nalezeny v žádném ze zkoumaných parenchymatózních orgánů a jedinou patologií byla výše popsaná reaktivní nebo reparativní fibroplázie myokardu u jednoho zvířete osídleného hMSC od zdravého dárce (**Jokinen MP, 2011**). Bohužel, ani zde nebyla vyšetření orgánů provedena dle lékopisu na certifikovaném pracovišti a jsou tedy z regulačního hlediska nepostačující.

Shrnutě, v našich experimentech jsme zjistili, že hMSC pěstované v CellGro™ s lidským sérem a suplementy jsou bezpečné a účinné, pokud jsou podány imunodeficientním hlodavcům. Na tomto závěru nemění nic to, že vyšetření zvířat neproběhlo přesně dle lékopisných požadavků. Takové vyšetření je pochopitelně nutné z regulačních důvodů, ale je možno ho provést dodatečně na menším počtu pokusných zvířat.

#### 6.4. Další osud hMSC produktu kultivovaného v CellGro™ s lidským sérem a suplementy

V současné době zůstává budoucnost námi vykultivovaných buněk coby léčiva pro klinické aplikace nejistá. Je nutno rozšířit cytogenetické experimenty, cíleně se zaměřit na znaky senescence, preferenčně též vzhledem k možnému

použití v imunomodulaci též zjistit jejich imunosupresivní potenciál. Za předpokladu dostatku financí je možno poměrně rychle doplnit bezpečnostní studie tak, jak jsou požadovány lékopisem.

Na druhé straně vývoj kultivace hMSC, zejména s užíváním destičkových produktů, výrazně pokročil. Není jasné, jaká by byla performance buněk (v jakékoli aplikaci) kultivovaných námi vyvinutým způsobem ve srovnání s performancí hMSC pěstovaných s destičkovými produkty. Nakonec není jasná ani rentabilita produktu, jehož cena je díky použití clinical grade suplementů ve srovnání s jinými metodami kultivace vysoká.

## 7. Souhrn a závěry

1. Zjistili jsme, že hrubý přípravek BMSC nenapomáhá regeneraci srdečního svalů po infarktu myokardu, ale intraarteriální podání přináší slibné výsledky u léčby ischemické choroby dolních končetin, což se týče hojení defektů, úlevy od bolesti a zlepšení kvality života. Nešlo ovšem o randomizovanou klinickou studii, takže výsledky je nutno interpretovat opatrně.
2. Podařilo se vyvinout rychlou kultivaci hMSC dosahující výrazně lepších výsledků než klasická kultivace hMSC v alfa-MEM médiu s FCS. Vyvinutý způsob byl založen na použití clinical grade média CellGro™ SCCM (stem cell cultivation medium) s 10% lidským sérem a suplementy - askorbát, dexamethason, inzulin, EGF, PDGF-BB, FGF-2, eventuálně též M-CSF. Uvedeným způsobem jsme konzistentně dosahovali po 2 týdnech kultivace výtěžků kolem  $2.5 \times 10^6$  hMSC na  $10^6$  použitých BMSC, oproti cca  $5 \times 10^4$  hMSC/ $10^6$  BMSC při použití média alfa-MEM s FCS.
3. Lidské MSC vypěstované v médiu založeném na CellGro™ splňovaly konsenzuální kritéria pro mezenchymální stromální buňky, tj. adhezenci k plastu, expresi CD73, CD90 a CD105 bez exprese hematopoetických znaků a diferenciaci do třech linií (osteogenní, chondrogenní, adipogenní). Jejich pohotovost k diferenciaci do osteogenní linie se zdála lepší jak *in vitro*, tak *in vivo* než u hMSC kultivovaných v alfa-MEM + FCS. Toto bylo podpořeno profily genové exprese, kde v hMSC kultivovaných v CellGro™ + LS + S bylo zvýšeně exprimováno několik genů důležitých pro kostní a kosterní vývoj a osifikaci, jmenovitě CDH11, COL1A1, CTGF, IGFBP3, a ARID5B. Současně byla zvýšena exprese genů, které přerušují dráhu PPAR-gamma, nutnou pro adipogenní diferenciaci.
4. Lidské MSC kultivované v CellGro™ + LS + S podporovaly časně po nasazení krvetvorbu, patrně v preexistujících hematopoetických niche, a to patrně lépe než hMSC kultivované v alfa-MEM + FCS, protože na rozdíl od nich podporovaly též růst erytroidních buněk. Postup bez odmývání krvetvorných buněk umožnil těmto niche dále se rozvíjet v průběhu buněčné kultury.
5. Nezjistili jsme žádný zázračný způsob pro kryoprezervaci hMSC. Kultivační média pouze s DMSO byla stejně dobrá jako média suplementovaná lidským či zvířecím sérem. Komerčně vyráběné médium MSC Freezing Solution (Biological Industries, Cromwell, CT, USA) se nezdálo být lepší než jakékoli jiné. Sericin se v kryoprezervaci hMSC neosvědčil, i když snad jeho použití v malém množství může napomoci snížení koncentrace DMSO. Sledování koloniformní kapacity hMSC před a po zamražení může být lepším způsobem hodnocení funkční zdatnosti hMSC než klasická zjišťování viability trypanovou modří nebo pomocí imunofluorescence.
6. Nově vyvinutý postup pro kultivaci hMSC je v preklinických zvířecích modelech bezpečný a účinný. Podané hMSC jen výjimečně migrují do vzdálených orgánů, nepůsobí žádné orgánové poškození, nepůsobí poruchy krvetvorby a nepůsobí ani nádory. Po kultivaci v CellGro™ + LS + S jsou hMSC podané na poly-laktidovém scaffoldu schopné lepší tvorby



kosti v heterotopickém modelu u imunodeficientních myší než hMSC z alfa-MEM + FCS. Při podání hMSC z CellGro™ + LS + S v plazmatické sraženině do kritického femorálního defektu u imunodeficientních potkanů přežívají buňky v defektu až 16 týdnů, nemigrují do vzdálených orgánů, zlepšují novotvorbu kosti v prvních 8 týdnech experimentu a zlepšují vaskularizaci reziduálního defektu. Účinné jsou však pouze hMSC od zdravých dárců, nikoli od pacientů s hematologickými malignitami a to ani za předpokladu, že tito pacienti nemají postižení kostní dřeně nádorem.

7. Byla provedena řada kroků k přenosu kultivace hMSC v CellGro™ + LS + S do podmínek GMP: záměna research grade suplementů za clinical grade, ověření možnosti kultivace v nádobách Roboflask pro eventuální robotickou produkci a vynechání antibiotik. Též byla zajištěna patentová ochrana kultivačního způsobu. Na druhé straně bylo zjištěno, že hMSC kultivované v CellGro™ s LS a S mají cytogenetické aberace, včetně klonálních. Klinická studie s novým způsobem kultivovanými hMSC tudíž není možná do doby, než se prokáže, že tyto aberace neznamenaají počínající nádorovou transformaci ani nejsou známkou senescence vykultivovaných buněk.

## Literatura

- Aguilera KY, Brekken RA. Recruitment and retention: factors that affect pericyte migration. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71: 299-309.
- Ahmadbeigi N, Soleimani M, Babaeijandaghi F et al. The aggregate nature of human mesenchymal stromal cells in native bone marrow. *Cytotherapy.* 2012; 14: 917-924.
- Al-Saqi SH, Saliem M, Quezada HC et al. Defined serum and xeno-free cryopreservation of mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank.* 2015; 16: 181–193.
- Albert P, Boilly B, Courty J, Barritault D. Stimulation in cell culture of mesenchymal cells of newt limb blastemas by EDGF I or II (basic or acidic FGF). *Cell Differ.* 1987; 21: 63-68.
- Alexaki VI, Simantiraki D, Panayiotopoulou M et al. Adipose tissue-derived mesenchymal cells support skin reepithelialization through secretion of KGF-1 and PDGF-BB: comparison with dermal fibroblasts. *Cell Transplant.* 2012; 21: 2441-2454.
- Alharbi Z, Almakadi S, Opländer C et al. Intraoperative use of enriched collagen and elastin matrices with freshly isolated adipose-derived stem/stromal cells: a potential clinical approach for soft tissue reconstruction. *BMC Surg.* 2014; 14: 10. doi: 10.1186/1471-2482-14-10.
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature.* 2003; 425: 968-973.
- Angelo PC, Ferreira AC, Fonseca VD et al. Cryopreservation does not alter karyotype, multipotency, or NANOG/SOX2 gene expression of amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Genet Mol Res.* 2012; 11: 1002–1012.
- Aoki R, Shoshkes-Carmel M, Gao N et al. Foxl1-expressing mesenchymal cells constitute the intestinal stem cell niche. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2016; 2: 175-188.
- Aramwit P, Siritientong T, Srichana T. Potential applications of silk sericin, a natural protein from textile industry by-products. *Waste Management Research.* 2012; 30: 217–224.
- Arnous S, Mozid A, Martin J, Mathur A. Bone marrow mononuclear cells and acute myocardial infarction. *Stem Cell Res Ther.* 2012 Jan; 3(1):2. doi: 10.1186/scrt93.
- Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol* 2003; 31: 723–732.
- Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. 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* 2005; 106: 3012–3019.

- Balk SD, Riley TM, Gunther HS, Morisi A. Heparin-treated, v-myc-transformed chicken heart mesenchymal cells assume a normal morphology but are hypersensitive to epidermal growth factor (EGF) and brain fibroblast growth factor (bFGF); cells transformed by the v-Ha-ras oncogene are refractory to EGF and bFGF but are hypersensitive to insulin-like growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82: 5781-5785.
- Balk SD, Shiu RP, LaFleur MM, Young LL. Epidermal growth factor and insulin cause normal chicken heart mesenchymal cells to proliferate like their Rous sarcoma virus-infected counterparts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982; 79: 1154-1157.
- Bang C, Thum T. Exosomes: new players in cell-cell communication. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012; 44: 2060-2064.
- Bardai G, Lemyre E, Moffatt P et al. Osteogenesis Imperfecta Type I Caused by COL1A1 Deletions. *Calcif Tissue Int*. 2016; 98: 76-84.
- Bartosh TJ, Ylöstalo JH, Bazhanov N et al. Dynamic compaction of human mesenchymal stem/precursor cells into spheres self-activates caspase-dependent IL1 signaling to enhance secretion of modulators of inflammation and immunity (PGE2, TSG6, and STC1). *Stem Cells*. 2013; 31: 2443-2456.
- Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM, Hill AF. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol*. 2012; 3: 124.
- Bernardi M, Agostini F, Chiericato K et al. The production method affects the efficacy of platelet derivatives to expand mesenchymal stromal cells in vitro. *J Transl Med*. 2017; 15: 90. doi: 10.1186/s12967-017-1185-9.
- Bernardo ME, Zafaroni N, Novara F et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Research*. 2007; 67: 9142-9149.
- Berney T, Molano RD, Pileggi A et al. Patterns of engraftment in different strains of immunodeficient mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes. *Transplantation*. 2000; 72: 133-140.
- Bieback K, Hecker A, Kocaömer A et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*. 2009; 27: 2331-2341.
- Bieback K, Wuchter P, Besser D et al. Mesenchymal stromal cells (MSCs): science and f(r)iction. *Journal of Molecular Medicine*. 2012; 90: 773-782.
- Bieback K. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfus Med Hemother*. 2013; 40: 326-335.
- Blau O, Baldus CD, Hofmann WK et al. Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. *Blood*. 2011; 118: 5583-5592.

- Breitbach M, Bostani T, Roell W et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*. 2007; 110: 1362-1369.
- Briquet A, Halleux A, Lechanteur C, Beguin Y. Neuropeptides to replace serum in cryopreservation of mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy*. 2013; 15: 1385-1394.
- Bruns I, Lucas D, Pinho S et al. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med*. 2014; 20: 1315-1320.
- Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008; 45: 115-120.
- Calvi LM, Link DC. The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. *Blood*. 2015; 126: 2443-2451.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8:729-740.
- Camussi G, Deregibus MC, Bruno S et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int*. 2010; 78: 838-848.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013;497: 67-73.
- Capelli C, Domenghini M, Borleri G et al. Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40: 785–791.
- Caplan AI, Correa D. The MSC: An injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011; 9: 11-15.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006; 98: 1076-1084.
- Caplan AI: Mesenchymal stem cells: when, where and how. *Stem Cells International*, Volume 2015, Article ID 628767, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/628767>.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991; 9: 641–650.
- Casey ML, MacDonald PC. Keratinocyte growth factor expression in the mesenchymal cells of human amnion. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82: 3319-3323.
- Cassiede P, Dennis JE, Ma F, Caplan AI. Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res*. 1996;11: 1264-1273.
- Catacchio I, Beradre S, Reale A et al. Evidence for Bone Marrow Adult Stem Cell Plasticity: Properties, Molecular Mechanisms, Negative Aspects, and Clinical Applications of Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells Transdifferentiation. *Stem Cell Int*. 2013; 2013: 589139. doi: 10.1155/2013/589139. Epub 2013 Mar 27.
- Caterson EJ, Nesti LJ, Danielson KG, Tuan RS. Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Isolation, culture expansion and analysis of

- differentiation. *Molecular Biotechnology*. 2002; 20: 245-256.
- Caterson EJ, Nesti LJ, Danielson KG, Tuan RS. Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Isolation, culture expansion and analysis of differentiation. *Molecular Biotechnology*. 2002; 20: 245-256. See comment in PubMed Commons below
- Chang HK, Kim PH, Cho HM et al. Inducible HGF-secreting human umbilical cord blood-derived MSCs produced via TALEN-mediated genome editing promoted angiogenesis. *Mol Ther*. 2016; 24: 1644-1654.
- Chaput N, Théry C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol*. 2011; 33: 419-440.
- Chen CY, Liu SH, Chen CY et al. Human placenta-derived multipotent mesenchymal stromal cells involved in placental angiogenesis via the PDGF-BB and STAT3 pathways. *Biol Reprod*. 2015; 93: 103. doi: 10.1095/biolreprod.115.131250.
- Chen W, Liu J, Manuchehrabadi N, et al. Umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cell seeding on macroporous calcium phosphate for bone regeneration in rat cranial defects. *Biomaterials*. 2013; 34: 9917-9925.
- Chinnadurai R, Garcia MA, Sakurai Y et al. Actin cytoskeletal disruption following cryopreservation alters the biodistribution of human mesenchymal stromal cells in vivo. *Stem Cell Reports*. 2014; 3: 60–72.
- Chochola M, Pytlík R, Kobylka P et al. Autologous intra-arterial infusion of bone marrow mononuclear cells in patients with critical leg ischemia. *Int Angiol*. 2008; 27: 281-90.
- Choi KM, Seo YK, Yoon HH et al. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng*. 2008; 105: 586-594..
- Ciapetti G, Granchi D, Baldini N. The combined use of mesenchymal stromal cells and scaffolds for bone repair. *Curr Pharm Des*. 2012; 18: 1796-1820.
- Cives M, Rizzo F, Simone V et al. Reviewing the Osteotropism in Neuroendocrine Tumors: The Role of Epithelial-Mesenchymal Transition. *Neuroendocrinology*. 2016; 103: 321-334.
- Clarke MR, Imhoff FM, Baird SK. Mesenchymal stem cells inhibit breast cancer cell migration and invasion through secretion of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2. *Mol Carcinog*. 2015; 54: 1214-1219.
- Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 3213-3218.
- Coutu DL, François M, Galipeau J. Inhibition of cellular senescence by developmentally regulated FGF receptors in mesenchymal stem cells. *Blood*. 2011; 117: 6801-6812..
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008; 3, 301–313.

- Cuomo AV, Virk M, Petrigliano F et al. Mesenchymal stem cell concentration and bone repair: potential pitfalls from bench to bedside. *J Bone Joint Surg Am.* 2009; 91-A: 1073-1083.
- Dahl JA, Duggal S, Coulston N et al. Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum. *Int J Dev Biol.* 2008; 52: 1033-1042.
- Dai Z, Shu Y, Wan C, Wu C. Effects of pH and thermally sensitive hybrid gels on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomater Appl.* 2015; 29: 1272-1283.
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 1928-1942.
- De Rosa A, De Francesco F, Tirino V et al. A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: An attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009; 15: 659-667.
- Delwiche F, Raines E, Powell J et al. Platelet-derived growth factor enhances in vitro erythropoiesis via stimulation of mesenchymal cells. *J Clin Invest* 1985; 76: 137-142.
- Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF et al. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci.* 2000; 113 Pt 19: 3365-3374.
- Devine SM, Cobbs C, Jennings M et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood.* 2003; 101: 2999-3001.
- Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol.* 1977; 91: 335-344.
- Dexter TM, Lajtha LG. Proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *Br J Haematol.* 1974; 28: 525-30.
- Di Benedetto A, Watkins M, Grimston S et al. N cadherin and cadherin 11 modulate postnatal bone growth and osteoblast differentiation by distinct mechanisms. *J Cell Sci.* 2010; 123(Pt 15): 2640-2648.
- Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant.* 2015; 24: 339-347.
- Ding W, Knox TR, Tschumper RC et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-PDGF receptor interaction activates bone marrow-derived mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch. *Blood.* 2010; 116: 2984-2993.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8: 315-317.
- Dominici M, Rasini V, Bussolari R et al. Restoration and reversible expansion of the

- osteoblastic hematopoietic stem cell niche after marrow radioablation. *Blood*. 2009; 114(11): 2333-43.
- Dong LH, Jiang YY, Liu YJ et al. The anti-fibrotic effects of mesenchymal stem cells on irradiated lungs via stimulating endogenous secretion of HGF and PGE2. *Sci Rep*. 2015 Mar 4;5:8713. doi: 10.1038/srep08713.
- Du M, Zhu T, Duan X et al. Acellular dermal matrix loading with bFGF achieves similar acceleration of bone regeneration to BMP-2 via differential effects on recruitment, proliferation and sustained osteodifferentiation of mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017; 70(Pt 1): 62-70.
- Dubsky M, Jirkovska A, Bem R et al. Both autologous bone marrow mononuclear cell and peripheral blood progenitor cell therapies similarly improve ischaemia in patients with diabetic foot in comparison with control treatment. *Diabetes Metab Res Rev*. 2013; 29: 369-376.
- Dulugiac M, Moldovan L, Zarnescu O. Comparative studies of mesenchymal stem cells derived from different cord tissue compartments - The influence of cryopreservation and growth media. *Placenta*. 2015; 36: 1192-1203.
- Dunning MJ, Smith M, Ritchie ME, and Tavaré S. bedarray: R classes and methods for Illumina bead-based data. *Bioinformatics*. 2007; 23: 2183 –2184; 2007
- Elahi KC, Klein G, Avci-Adali M et al. Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns. *Stem Cells Int*. 2016; 2016:5646384. doi: 10.1155/2016/5646384.
- EMA. Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products. EMA Editor. London (UK): 7 Westferry Circus Canary Wharf; 2011.
- EMA/CHMP/BWP. Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products. EMA Editor, London (UK): 7 Westferry Circus Canary Wharf; 2013.
- EMA/CHMP. Guideline on human cell-based medicinal products. EMEA Editor. London, UK: 7 Westferry Circus, Canary Wharf; 2008.
- Escobar CH, Chaparro O. Xeno-Free Extraction, Culture, and Cryopreservation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2016; 5: 358-365.
- Estrada JC, Torres Y, Benguría A et al. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. *Cell Death Dis*. 2013 Jun 27;4:e691. doi: 10.1038/cddis.2013.211.
- Fazili A, Gholami S, Minaie Zangi B, Seyedjafari E, Gholami M. In Vivo Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Insulin Producing Cells on Electrospun Poly-L-Lactide Acid Scaffolds Coated with *Matricaria chamomilla* L. Oil. *Cell J*. 2016; 18: 310-321.
- Fei C, Zhao Y, Gu S et al. Impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with lower-risk



- myelodysplastic syndromes. *Tumour Biol.* 2014; 35: 4307-4316.
- Fekete N, Rojewski MT, Lotfi R, Schrezenmeier H. Essential components for ex vivo proliferation of mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014; 20: 129-139.
- Ferreira RJ, Irioda AC, Cunha RC et al. Controversies about the chromosomal stability of cultivated mesenchymal stem cells: their clinical use is it safe? *Current Stem Cell Research and Therapy.* 2012; 7: 356-36
- Fisher SA, Doree C, Mathur A et al. Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 12: CD007888. doi: 10.1002/14651858.CD007888.pub3.
- Fisher SA, Zhang H, Doree C et al. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015; (9): CD006536. doi: 10.1002/14651858.CD006536.pub4.
- Forte G, Minieri M, Cossa P et al. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation. *Stem Cells.* 2006; 24 :23-33.
- Fountain D, Ralston M, Higgins N et al. Liquid nitrogen freezers: A potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion.* 1997; 37: 585-591.
- Francois M, Copland IB, Yuan S, et al. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon-gamma licensing. *Cytotherapy.* 2012; 14: 147-152.
- Francois S, Mensidhoum M, Mouiseddine M, et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: A study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells.* 2006; 24: 1020 -1029.
- Fraser JK, Hicok KC, Shanahan R, et al. The Celution® system: Automated processing of adipose-derived regenerative cells in a functionally closed system. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2014; 3: 38-45.
- French SW, K. K. Hoyer KK, Shen RR, Teitell MA. Transdifferentiation and nuclear reprogramming in hematopoietic development and neoplasia," *Immunological Reviews.* 2002; 187, 22-39.
- Friedenstein AJ, Deriglazova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol.* 1974; 2: 83-92.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968; 6: 230-247.
- Friedenstein AJ. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol Blood Transfus.* 1980; 25: 19-29.
- Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M et al. Nonendothelial mesenchymal cell-derived

- MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 2483-2489.
- Fukuda K, Fujita J. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int.* 2005; 68: 1940-1943.
- Galipeau J. The mesenchymal stromal cells dilemma--does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytotherapy.* 2013; 15: 2-8.
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs.* 2001; 169: 12-20.
- Gartner S, Kaplan HS. Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77: 4756-4759.
- Geng T, Sun H, Luo F, Qi N. Quantitative analysis of the responses of murine bone marrow mesenchymal stem cells to EGF, PDGF-BB and fibronectin by factorial design methodology. *Cytotechnology.* 2008; 58: 93-101.
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007; 100: 1249-1260.
- Ginis I, Grinblat B, Shirvan MH. Evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after cryopreservation and hypothermic storage in clinically safe medium. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012; 18: 453-463.
- Gonda K, Shigeura T, Sato T et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast Reconstr Surg.* 2008; 121: 401-410.
- Gottschling S, Saffrich R, Seckinger A et al. Human mesenchymal stromal cells regulate initial self-renewing divisions of hematopoietic progenitor cells by a beta1-integrin-dependent mechanism. *Stem Cells.* 2007; 25: 798-806.
- Gratwohl A, Baldomero H, Schmid O et al. Change in stem cell source for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Europe: a report of the EBMT activity survey 2003. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 36: 575-590.
- Greenbaum A, Hsu YM, Day RB et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature.* 2013;495(7440):227-230.
- Griffiths S, Baraniak PR, Copland IB et al. Human platelet lysate stimulates high-passage and senescent human multipotent mesenchymal stromal cell growth and rejuvenation in vitro. *Cytotherapy.* 2013; 15: 1469-1483.
- Grinnemo KH, Månsson A, Dellgren G et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; 127: 1293-1300.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J et al. Postnatal human dental pulp stem cells

- (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 13625-13630.
- Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood*. 1995; 85: 929-940.
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999; 401: 390-394.
- Ham O, Lee SY, Song BW et al. Modulation of Fas-Fas Ligand Interaction Rehabilitates Hypoxia-Induced Apoptosis of Mesenchymal Stem Cells in Ischemic Myocardium Niche. *Cell Transplant*. 2015; 24: 1329-1341. doi: 10.3727/096368914X681748.
- Hao C, Wang Y, Shao L et al. Local Injection of Bone Mesenchymal Stem Cells and Fibrin Glue Promotes the Repair of Bone Atrophic Nonunion In Vivo. *Adv Ther*. 2016; 33: 824-833.
- Hass R, C. Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*. 2011; 9: 12. <http://www.biosignaling.com/content/9/1/12>
- Hata K, Takashima R, Amano K et al. Arid5b facilitates chondrogenesis by recruiting the histone demethylase Phf2 to Sox9-regulated genes. *Nat Commun*. 2013; 4: 2850. doi: 10.1038/ncomms3850
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961; 25: 585-621.
- Haynesworth S, Baber M, Caplan A. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 1992; 13: 69-80.
- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol*. 1996 Mar;166(3):585-592.
- Healy ME, Bergin R, Mahon BP, English K. Mesenchymal stromal cells protect against caspase 3-mediated apoptosis of CD19(+) peripheral B cells through contact-dependent upregulation of VEGF. *Stem Cells Dev*. 2015; 24: 2391-2402.
- Heldin CH, Landström M, Moustakas A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol*. 2009; 21: 166-176.
- Hendesi H, Barbe MF, Safadi FF et al. Integrin mediated adhesion of osteoblasts to connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) induces cytoskeleton reorganization and cell differentiation. *PLoS One*. 2015; 10(2): e0115325. doi: 10.1371/journal.pone.0115325.
- Henrich D, Nau C, Kraft SB et al. Effect of the harvest procedure and tissue site on the osteogenic function of and gene expression in human mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med*. 2016; 37: 976-988.

- Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc. Res.* 1996; 32, 687–698.
- Hong J, Hueckelhoven A, Wang L et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates inhibition of virus-specific CD8(+) T cell proliferation by human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2016; 18: 621-629.
- Hoogduijn MS, de Witte SFH, Luk F et al. Effects of Freeze–Thawing and Intravenous Infusion on Mesenchymal Stromal Cell Gene Expression. *Stem Cells And Development.* 2016; 25: 586-597.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 8932-8937
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Med.* 1999; 5: 309–313.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood.* 2001; 97: 1227-1331.
- Hsiao ST, Asgari A, Lokmic Z et al. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. *Stem Cells Dev.* 2012; 21: 2189-2203.
- Hsiao ST, Lokmic Z, Peshavariya H et al. Hypoxic conditioning enhances the angiogenic paracrine activity of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* 2013; 22: 1614-1623.
- Huang CK, Lai KP, Luo J et al. Loss of androgen receptor promotes adipogenesis but suppresses osteogenesis in bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res.* 2013; 11: 938-950.
- Huang GP, Pan ZJ, Jia BB et al. Ex vivo expansion and transplantation of hematopoietic stem/progenitor cells supported by mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Cell Transplant.* 2007; 16: 579-585.
- Huang S, Xu L, Zhang Y et al. Systemic and Local Administration of Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promotes Fracture Healing in Rats. *Cell Transplant.* 2015; 24: 2643-2655.
- Huang W, La R, V, Alzoubi A et al. Interleukin-17A: a T-cell-derived growth factor for murine and human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006; 24: 1512–1518.
- Huat TJ, Khan AA, Pati S et al. IGF-1 enhances cell proliferation and survival during early differentiation of mesenchymal stem cells to neural progenitor-like cells. *BMC Neurosci.* 2014; 15: 91. doi: 10.1186/1471-2202-15-91.
- Humpert PM, Djuric Z, Zeuge U et al. Insulin stimulates the clonogenic potential of angiogenic endothelial progenitor cells by IGF-1 receptor-dependent signaling. *Mol Med.* 2008; 14: 301-308. Chen CY, Liu SH, Chen CY et al.
- Hwang NS, Varghese S, Lee HJ et al. Biomaterials directed in vivo osteogenic

- differentiation of mesenchymal cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2013; 19: 1723-1732.
- Ieronimakis N, Hays A, Prasad A et al. PDGFR $\alpha$  signalling promotes fibrogenic responses in collagen-producing cells in Duchenne muscular dystrophy. *J Pathol*. 2016; 240: 410-424.
- In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 2003; 102: 1548-1549.
- Iso Y, Spees JL, Serrano C et al. Multipotent human stromal cells improv cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354: 700–706.
- Israel M, Barbash IM, Chouraqui P, Baron D et al. Systemic delivery of bone marrow–derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium. Feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003; 108: 863-868.
- Ito T, Sawada R, Fujiwara Y et al. FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF-beta2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 359: 108-114.
- Iwasaki H, Suda T. Cancer stem cells and their niche. *Cancer Sci*. 2009; 100: 1166-1172.
- Iwatani M, Ikegami K, Kremenska Y et al. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells*. 2006;24:2549–2556.
- Iyer SS, Rojas M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opin. Biol. Ther*. 2008; 8: 569–581.
- Izuta Y, Ochi M, Adachi N et al. Meniscal repair using bone marrow-derived mesenchymal stem cells: experimental study using green fluorescent protein transgenic rats. *Knee*. 2005; 12: 217-223.
- Jackson KA, Majka SM, Wang H et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001; 107: 1395-1402.
- Jacobs K, Merthanidou A, Geens M et al. Low-grade chromosomal mosaicism in human somatic and embryonic stem cell populations. *Nature Communications*. 2014; Jun 27; 5:4227. doi: 10.1038/ncomms5227
- Jaing TH. Umbilical cord blood: a trustworthy source of multipotent stem cells for regenerative medicine. *Cell Transplant*. 2014; 23: 493-496.
- James AW, Levi B, Nelson ER et al. Deleterious effects of freezing on osteogenic differentiation of human adiposederived stromal cells in vitro and in vivo. *Stem Cells Dev*. 2011; 20: 427–439.
- Janz Fde L, Debes Ade A, Cavaglieri Rde C et al. Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 649353.
- Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ et al. Rat marrow stromal cells are more

- sensitive to plating density and expand more rapidly from single cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells*. 2001; 19: 219–225.
- Jiao F, Wang J, Dong ZL et al. Human mesenchymal stem cells derived from limb bud can differentiate into all three embryonic germ layers lineages. *Cell Reprogram*. 2012; 14: 324-333.
- Jin-Xiang F, Xiaofeng S, Jun-Chuan Q et al. Homing efficiency and hematopoietic reconstitution of bone marrow-derived stroma cells expanded by recombinant human macrophage-colony stimulating factor in vitro. *Exp Hematol* 2004; 32: 1204–1211.
- Jing D, Fonseca A-V, Alakel N et al. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells - modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica*. 2010; 95: 542-550.
- Jokinen MP, Lieuallen WG, Boyle MM et al. Morphologic aspects of rodent cardiotoxicity in a retrospective evaluation of National Toxicology Program Studies. *Toxicol Pathol*. 2011; 39: 850-860.
- Kaigler D, Krebsbach PH, West ER et al. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J*. 2005; 19: 665-667.
- Kelley C, D'Amore P, Hechtman HB, Shepro D. Microvascular pericyte contractility in vitro: Comparison with other cells of the vascular wall. *J. Cell Biol*. 1987; 104: 483–490.
- Kemp K, Wilkins A, Scolding N. Cell fusion in the brain: two cells forward, one cell back. *Acta Neuropathol*. 2014; 128: 629-638.
- Khubutiya MS, Vagabov AV, Temnov AA, Sklifas AN. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury. *Cytotherapy*. 2014; 16: 579-585.
- Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005; 121: 1109-1121.
- Kim CH, Lee JH, Won JH, Cho MK. Mesenchymal stem cells improve wound healing in vivo via early activation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor. *J Korean Med Sci*. 2011; 26: 726-733.
- Kim J, Kong J, Chang H et al. EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2016; 7: 85021-85032.
- Kim JH, Yoon SM, Song SU et al. Hypoxia Suppresses Spontaneous Mineralization and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells via IGFBP3 Up-Regulation. *Int J Mol Sci*. 2016 Aug; 17(9). pii: E1389. doi: 10.3390/ijms17091389.
- Kitoh H, Kawasumi M, Kaneko H, Kichihuro N. Differential effects of culture-expanded bone marrow cells on the regeneration of bone between the femoral and the tibial lengthenings. *Journal of Pediatric Orthopaedics*.

2009; 29: 643-649.

- Kmiecik G, Spoldi V, Silini A, Parolini O. Current view on osteogenic differentiation potential of mesenchymal stromal cells derived from placental tissues. *Stem Cell Rev.* 2015; 11: 570-585.
- Knight RL, Booth C, Wilcox HE et al. Tissue engineering of cardiac valves: re-seeding of acellular porcine aortic valve matrices with human mesenchymal progenitor cells. *J Heart Valve Dis.* 2005; 14: 806-813.
- Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 307-316.
- Koch H, Jadowiec JA, Campbell PG. Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2005; 14: 621-631.
- Konala VB, Mamidi MK, Bhonde R et al. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy.* 2016; 18: 13-24.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 10711-10716.
- Korbling M, Katz RL, Khanna A. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; 364: 738-476.
- Kosmacheva SM, Volk MV, Yeustratenka TA et al. Potapnev MP. In vitro growth of human umbilical blood mesenchymal stem cells and their differentiation into chondrocytes and osteoblasts. *Bull Exp Biol Med.* 2008; 145: 141-145.
- Krampera M, Pasini A, Rigo A et al. HBEGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: Inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood.* 2005; 106: 59-66.
- Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells.* 2010; 28: 2229-2238.
- Ksiazek K, Mikula-Pietrasik J, Jorres A et al. Oxidative stress-mediated early senescence contributes to the short replicative life span of human peritoneal mesothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45: 460-467.
- Ksiazek K. A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence. *Rejuvenation Research.* 2009; 12: 105-116.
- Kumar A, Prasad M, Jali VP et al. Bone marrow mononuclear cell therapy in ischaemic stroke: a systematic review. *Acta Neurol Scand.* 2017; 135: 496-506.
- Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature.* 2013; 502: 637-643.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhlimy M et al. Purified hematopoietic stem cells can



- differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Medicine*. 2000; 6: 1229–1234.
- Lancaster MA, Renner M, Martin CA et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly, *Nature* 2013; 501: 373–379.
- Le Blanc K, Samuelsson H, Lönnies L et al. Generation of immunosuppressive mesenchymal stem cells in allogeneic humanserum. *Transplantation*. 2007; 84(8): 1055-1059.
- Lee J, Gupta D, Panetta NJ et al. Elucidating mechanisms of osteogenesis in human adipose-derived stromal cells via microarray analysis. *J Craniofac Surg*. 2010; 21: 1136-1141.
- Li S, Zou D, Li C et al. Targeting stem cell niche can protect hematopoietic stem cells from chemotherapy and G-CSF treatment. *Stem Cell Res Ther*. 2015; 6: 175. doi: 10.1186/s13287-015-0164-4.
- Li X, Bai J, Ji X et al. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *Int J Mol Med*. 2014; 34: 695-704.
- Liu G, Li Y, Sun J et al. In vitro and in vivo evaluation of osteogenesis of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on partially demineralized bone matrix. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16: 971-982.
- Liu L, Gao J, Yuan Y et al. Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. *Cell Biol Int*. 2013; 37: 551-560.
- Liu Z, Liu H, Jiang J et al. PDGF-BB and bFGF ameliorate radiation-induced intestinal progenitor/stem cell apoptosis via Akt/p53 signaling in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014; 307: G1033-1043.
- Liu ZC, Chen XH, Song HX et al. Snail regulated by PKC/GSK-3 $\beta$  pathway is crucial for EGF-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells. *Cell Tissue Res*. 2014; 358: 491-502. doi: 10.1007/s00441-014-1953-2. Epub 2014 Aug 16.
- Long DA, Price KL, Ioffe E et al. Angiopoietin-1 therapy enhances fibrosis and inflammation following folic acid-induced acute renal injury. *Kidney Int*. 2008; 74: 300-309.
- Longobardi L, O'Rear L, Aakula S et al. Effect of IGFI in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *Bone Miner Res*. 2006; 21: 626–636.
- Lu D, Li Y, Wang L et al. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2001; 18: 813-819.
- Lucchini G, Inrona M, Dander E et al. Platelet-lysate expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010; 16: 1293-1301.
- Luria EA, Owen ME, Friedenstien AJ, Morris JF, Kuznetsow SA. Bone formation in organ cultures of bone marrow. *Cell Tissue Res*. 1987; 248: 449-454.

- Mackenzie TC, Flake AW. Human mesenchymal stem cells persist, demonstrate site-specific multipotential differentiation, and are present in sites of wound healing and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep. *Blood Cells Mol Dis.* 2001; 27: 601-604.
- Maegawa N, Kawamura K, Hirose M et al. Enhancement of osteoblastic differentiation of mesenchymal stromal cells cultured by selective combination of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Tissue Eng Regen Med.* 2007; 1: 306-313.
- Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol.* 1998 Jul;176(1):57-66.
- Maltais S, Perrault LP, Ly HQ. The bone marrow-cardiac axis: role of endothelial progenitor cells in heart failure. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011; 39: 368-374.
- Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim DH. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv.* 2016; 34: 422-434. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.01.
- Marie PJ, Hay E, Modrowski D et al. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and signaling in the skeleton. *Calcif Tissue Int.* 2014; 94: 46-54.
- Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem.* 2005; 95: 827-839.
- McCall-Culbreath KD, Li Z, Zutter MM. Crosstalk between the alpha2beta1 integrin and c-met/HGF-R regulates innate immunity. *Blood.* 2008; 111: 3562-3570.
- Medyouf H, Mossner M, Jann JC et al. Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. *Cell Stem Cell.* 2014; 14: 824-837.
- Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20: 419-427.
- Melzer C, von der Ohe J, Lehnert H et al. Cancer stem cell niche models and contribution by mesenchymal stroma/stem cells. *Mol Cancer.* 2017; 16: 28. doi: 10.1186/s12943-017-0595-x.
- Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature.* 2008; 452: 442-447.
- Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010; 466: 829-834.
- Meuleman N, Tondreau T, Delforge A et al. Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *Eur J Haematol.* 2006; 76: 309-316.
- Meyerrose TE, De Ugarte DA, Hofling AA et al. In vivo distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation

- models. *Stem Cells*. 2007; 25: 220-227.
- Michel J, Penna M, Kochen J, Cheung H. Recent Advances in Hydroxyapatite Scaffolds Containing Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2015; 2015: 305217. doi: 10.1155/2015/305217.
- Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001; 226: 507-520.
- Miranda-Sayago JM, Fernandez-Arcas N, Benito C et al. Evaluation of a low cost cryopreservation system on the biology of human amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cells. *Cryobiology*. 2012; 64: 160–166.
- Mitchell A, Rivas KA, Smith R 3rd, Watts AE. Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95% autologous serum and 5% DMSO does not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95% and DMSO at 10 or 5. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Nov 26; 6: 231. doi: 10.1186/s13287-015-0230-y.
- Miyamoto Y, Oishi K, Yukawa H, et al. Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplantation*. 2012; 21: 617–622.
- Moazzami K, Moazzami B, Roohi A et al. Local intramuscular transplantation of autologous mononuclear cells for critical lower limb ischaemia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; (12): CD008347. doi: 10.1002/14651858.CD008347.pub3.
- Moll G, Alm JJ, Davies LC, et al. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? *Stem Cells*. 2014; 32: 2430–2442.
- Moon JH, Lee JR, Jee BC et al. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum Reprod*. 2008; 23: 1760–1770.
- Moore MA, Sheridan AP, Allen TD, Dexter TM. Prolonged hematopoiesis in a primate bone marrow culture system: characteristics of stem cell production and the hematopoietic microenvironment. *Blood*. 1979; 54: 775-93.
- Mostafa NZ, Fitzsimmons R, Major PW et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells cultured with dexamethasone, vitamin D3, basic fibroblast growth factor, and bone morphogenetic protein-2. *Connect Tissue Res*. 2012; 53: 117-131.
- Muntión S, Sánchez-Guijo FM, Carrancio S et al. Optimisation of mesenchymal stromal cells karyotyping analysis: implications for clinical use. *Transfusion Medicine*. 2012; 20: 122-127.
- Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am*. 1997; 79: 1699-1709.
- Musina RA, Bekchanova ES, Belyavskii AV et al. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells. *Bull Exp Biol Med*. 2007; 143: 127–131.
- Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT. Comparison of mesenchymal stem cells

- obtained from different human tissues. *Bull Exp Biol Med.* 2005; 139: 504–509.
- Musina RA, Belyavski AV, Tarusova OV et al. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. *Bull Exp Biol Med.* 2008; 145: 539-543.
- Najar M, Raicevic G, André T et al. Mesenchymal stromal cells from the foreskin: Tissue isolation, cell characterization and immunobiological properties. *Cytotherapy.* 2016; 18: 320-335.
- Najar M, Raicevic G, Boufker HI et al. Adipose-tissue-derived and Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells suppress lymphocyte responses by secreting leukemia inhibitory factor. *Tissue Eng Part A.* 2010; 16: 3537-3546.
- Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood.* 2006; 108: 2114-2120.
- Ng F, Boucher S, Koh S et al. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood.* 2008; 112: 295-307.
- Normanton M, Alvarenga H, Hamerschlak N et al. Interleukin 7 plays a role in T lymphocyte apoptosis inhibition driven by mesenchymal stem cell without favoring proliferation and cytokines secretion. *PLoS One.* 2014; 9: e106673. doi: 10.1371/journal.pone.0106673.
- Novotová E, Strnadová H, Procházka B, Pytlík R. In vitro kultivace mezenchymových kmenových buněk u pacientů s lymfoidními malignitami. *Transfuzie a hematologie dnes.* 2003; 9: 30-36.
- Okada Y, Terao C, Ikari K et al. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2012; 44: 511-516.
- Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity.* 2010; 33: 387-399.
- Orlidge A, D'Amore PA. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 1987; 105: 1455–1462.
- Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA Jr et al. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2004; 22: 1263-1278.
- Peeters Weem SM, Teraa M, de Borst GJ et al. Bone Marrow derived Cell Therapy in Critical Limb Ischemia: A Meta-analysis of Randomized Placebo Controlled Trials. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2015; 50: 775-783.
- Penicka M, Horak J, Kobyłka P, Pytlík R, Kozak T, Belohlavek O, Lang O, Skalicka H, Simek S, Palecek T, Linhart A, Aschermann M, Widimsky P. Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction: a prematurely terminated

- randomized study. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49: 2373-4.
- Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for non-hematopoietic tissue in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 1142–1147.
- Peterson B, Zhang J, Iglesias R et al. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng.* 2005; 11: 120-129.
- Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells.* 2007; 25: 2896–2902.
- Pierantozzi E, Badin, M, Vezzani B et al. Human pericytes isolated from adipose tissue have better differentiation abilities than their mesenchymal stem cell counterparts. *Cell Tissue Res.* 2015; 361: 769–778.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284: 143-147.
- Platt JL, Zhou X, Lefferts AR, Cascalho M. Cell fusion in the war on cancer: a perspective on the inception of malignancy. *Int J Mol Sci.* 2016 Jul 13;17(7). pii: E1118. doi: 10.3390/ijms17071118.
- Plotkin MD, Goligorsky MS. Mesenchymal cells from adult kidney support angiogenesis and differentiate into multiple interstitial cell types including erythropoietin-producing fibroblasts. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 291: F902-12.
- Pollock K, Budenske JW, McKenna DH et al. Algorithm-driven optimization of cryopreservation protocols for transfusion model cell types including Jurkat cells and mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016 May 27. doi: 10.1002/term.2175. [Epub ahead of print]
- Pons J, Huang Y, Arakawa-Hoyt J et al. VEGF improves survival of mesenchymal stem cells in infarcted hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 376: 419–422.
- Ponte AL, Ribeiro-Fleury T, Chabot V et al. Granulocyte-colony-stimulating factor stimulation of bone marrow mesenchymal stromal cells promotes CD34+ cell migration via a matrix metalloproteinase-2-dependent mechanism. *Stem Cells Dev.* 2012; 21: 3162-3172.
- Potdar PD, D'Souza SB. Ascorbic acid induces in vitro proliferation of human subcutaneous adipose tissue derived mesenchymal stem cells with upregulation of embryonic stem cell pluripotency markers Oct4 and SOX 2. *Hum Cell.* 2010; 23: 152-155.
- Prisco M, Romano G, Peruzzi F et al. Insulin and IGF-I receptors signaling in protection from apoptosis. *Horm Metab Res.* 1999; 31: 80-89.
- Prockop DJ. “Stemness” does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82: 241–243.

- Pytlík R, Rentsch C, Soukup T et al. Efficacy and safety of human mesenchymal stromal cells in healing of critical-size bone defects in immunodeficient rats. *Physiol Res*. 2017; 66: 113-123..
- Pytlík R, Slanař O, Stehlík D, Matějková E. Production of clinical grade mesenchymal stromal cells. In: Eberli D (editor). *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*, pp. 145-178. Intech 2011, ISBN 978-953-307-663-8.
- Pytlík R, Stehlík D, Soukup T et al. The cultivation of human multipotent mesenchymal stromal cells in clinical grade medium for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2009; 30: 3415-3427.
- Qiao H, Zhang R, Gao L et al. Molecular imaging for comparison of different growth factors on bone marrow-derived mesenchymal stromal cells' survival and proliferation in vivo. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:1363902. doi: 10.1155/2016/1363902.
- Quito FL, Beh J, Bashayan O et al. Effects of fibroblast growth factor-4 (k-FGF) on long-term cultures of human bone marrow cells. *Blood*. 1996; 87: 1282-1291.
- Ray SS, Pramanik K, Sarangi SK, Jain N. Serum-free non-toxic freezing solution for cryopreservation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett*. 2016; 38: 1397-1404.
- Reger RL, Wolfe MR. Freezing harvested hMSCs and recovery of hMSCs from frozen vials for subsequent expansion, analysis and experimentation. In: Prockop DJ, Phinney DG, Bunnell BA (editors). *Mesenchymal stem cells – methods and protocol*, pp 109-116. Humana Press 2007, ISBN 978-1-58829-771-6.
- Ren G, Zhang L, Zhao X et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008; 2: 141-150.
- Renzi S, Lombardo T, Dotti S, et al. Mesenchymal stromal cell cryopreservation. *Biopreservation and Biobanking*. 2012; 10: 276-281.
- Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer*. 2017; 16: 31. doi: 10.1186/s12943-017-0597-8.
- Risau W, Sariola H, Zerwes HG et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development*. 1988; 102: 471-478.
- Romanov SR, Kozakiewicz BK, Holst CR et al. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature*. 2001; 409: 633-637.
- Roobrouck VD, Clavel C, Jacobs SA et al. Differentiation potential of human postnatal mesenchymal stem cells, mesoangioblasts, and multipotent adult progenitor cells reflected in their transcriptome and partially influenced by the culture conditions. *Stem Cells*. 2011; 29: 871-882.
- Rotter N, Oder J, Schlenke P et al. Isolation and characterization of adult stem cells

- from human salivary glands. *Stem Cells Dev.* 2008; 17, 509–518.
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Research.* 2005; 65: 3035-3039.
- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Selfrenewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007; 131: 324-336.
- Sakamoto S, Yazawa T, Baba Y et al. Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011; 45: 489-497.
- Saki N, Abroun S, Farshdousti Hagh M, Asgharei F. Neoplastic bone marrow niche: hematopoietic and mesenchymal stem cells. *Cell J.* 2011; 13: 131-136.
- Salgado AJ, Sousa JC, Costa BM et al. Mesenchymal stem cells secretome as a modulator of the neurogenic niche: basic insights and therapeutic opportunities. *Front Cell Neurosci.* 2015 Jul 13; 9: 249. doi: 10.3389/fncel.2015.00249.
- Salido-Guadarrama I, Romero-Cordoba S, Peralta-Zaragoza O et al. MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer. *Onco Targets Ther.* 2014; 7: 1327–1338.
- Salmikangas P, Schuessler-Lenz M, Ruiz S et al. Marketing Regulatory Oversight of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs) in Europe: The EMA/CAT Perspective. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 871: 103-130.
- Sasaki S, Baba T, Nishimura T et al. Essential roles of the interaction between cancer cell-derived chemokine, CCL4, and intra-bone CCR5-expressing fibroblasts in breast cancer bone metastasis. *Cancer Lett.* 2016; 378: 23-32.
- Scherberich A, Di Maggio ND, McNagny KM. A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue. *World J Stem Cells.* 2013; 5: 1-8.
- Schuring AN, Schulte N, Kelsch R et al. Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertil. Steril* 2011; 95: 423–426.
- Sekiya I, Larson BL, Smith JR et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: Conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells.* 2002; 20: 530–541.
- Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T et al. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells.* 2005; 23: 1357–1366.
- Sharaf-Eldin WE, Abu-Shahba N, Mahmoud M, El-Badri N. The Modulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells on Osteoclastogenesis. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:1908365. doi: 10.1155/2016/1908365. □
- Sharma MB, Limaye LS, Kale VP. Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro : recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells. *Haematologica*



2012; 97: 651-660.

Sharma RI, Snedeker JG. Paracrine interactions between mesenchymal stem cells affect substrate driven differentiation toward tendon and bone phenotypes. *PLoS One*. 2012; 7: e31504. doi: 10.1371/journal.pone.0031504.

Shimazu T, Mori Y, Takahashi A et al. Serum- and xeno-free cryopreservation of human umbilical cord tissue as mesenchymal stromal cell source. *Cytotherapy*. 2015; 17: 593-600.

Shinmura D, Togashi I, Miyoshi S, et al. Pretreatment of human mesenchymal stem cells with pioglitazone improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and cardiac function. *Stem Cells*. 2011;29: 357-366.

Shyu KG, Hung HF, Wang BW, Chang H. Hyperbaric oxygen induces placental growth factor expression in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Life Sci*. 2008; 83(1-2):65-73.

Silva WA Jr, Covas DT, Panepucci RA et al. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2003; 21: 661-669.

Skibinski G, Skibinska A, James K. Hepatocyte growth factor (HGF) protects c-met-expressing Burkitt's lymphoma cell lines from apoptotic death induced by DNA damaging agents. *Eur J Cancer*. 2001; 37: 1562-1569.

Smith CL, Baek ST, Sung CY, Tallquist MD. Epicardial-derived cell epithelial-to-mesenchymal transition and fate specification require PDGF receptor signaling. *Circ Res*. 2011; 108(12): e15-26.

Smith TO, Sexton D, Mitchell P, Hing CB. Opening- or closing-wedged high tibial osteotomy: a meta-analysis of clinical and radiological outcomes. *Knee*. 2011; 18: 361-368.

Snyder J, Rin Son A, Hamid Q et al. Mesenchymal stem cell printing and process regulated cell properties. *Biofabrication*. 2015; 7(4): 044106. doi: 10.1088/1758-5090/7/4/044106.

Solchaga LA, Penick K, Porter JD et al. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2005; 203: 398-409.

Soncini M, Vertua E, Gibelli L, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007; 1 :296-305.

Song H, Kwon K, Lim S et al. Transfection of mesenchymal stem cells with the FGF-2 gene improves their survival under hypoxic conditions. *Mol Cells*. 2005; 19: 402-407.

Song YS, Adler D, Xu F et al. Vitrification and levitation of a liquid droplet on liquid nitrogen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 4596–4600.

Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006; 24: 462–471.

Soukup T, Mokřý J, Karbanová J et al. Mesenchymal stem cells isolated from the human bone marrow: cultivation, phenotypic analysis and changes in

- proliferation kinetics. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2006; 49: 27-33.
- Spees JL, Olson SD, Whitney MJ et al. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 1283–1288.
- Stehlík D, Pytlík R, Rychtrmocová H, Kideryová L, Veselá R, Kopečný Z, Trč T, Trněný M. Xenogeneic protein-free cultivation of mesenchymal stromal cells - towards clinical applications. *Folia Biol (Praha)*. 2012; 58: 106-114.
- Stehlík D, Pytlík R, Rychtrmocová H et al. Současné použití MSC v regeneraci hyalinní chrupavky. *Ortopedie*. 2015a; 9: 194-196.
- Stehlík D, Pytlík R, Rychtrmocová H et al. Současné klinické použití MSC k regeneraci kostní tkáně. *Ortopedie*. 2015b; 9: 198-202.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2003; 33: 919-926.
- Steward AJ, Kelly DJ. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J Anat*. 2015; 227: 717-731.
- Suchánková Kleplová T, Soukup T, Řeháček V, Suchánek J. Human plasma and human platelet-rich plasma as a substitute for fetal calf serum during long-term cultivation of mesenchymal dental pulp stem cells. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2014; 57: 119-126.
- Suenaga H, Furukawa KS, Suzuki Y et al. Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells spheroids. *J Mater Sci Mater Med*. 2015; 26: 254, , doi: 10.1007/s10856-015-5591-3.
- Sugimura R. Bioengineering Hematopoietic Stem Cell Niche toward Regenerative Medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016; 99: 212–220.
- Sun X, Gao X, Zhou L et al. PDGF-BB-induced MT1-MMP expression regulates proliferation and invasion of mesenchymal stem cells in 3-dimensional collagen via MEK/ERK1/2 and PI3K/AKT signaling. *Cell Signal*. 2013; 25: 1279-1287.
- Sundin M, Ringdén O, Sundberg B et al. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*. 2007; 92: 1208-1215.
- Taguchi T, Cho JY, Hao J et al. Influence of hypoxia on the stemness of umbilical cord matrix-derived mesenchymal stem cells cultured on chitosan films. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017 Feb 11. doi: 10.1002/jbm.b.33864. [Epub ahead of print]
- Takahashi Y, Tabata Y. Homogeneous seeding of mesenchymal stem cells into nonwoven fabric for tissue engineering. *Tissue Eng*. 2003; 9: 931-938.
- Tamama K, Fan VH, Griffith LG et al. Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006; 24: 686–695.
- Tan Y, Xiao EH, Xiao LZ et al. VEGF(165) expressing bone

- marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes under HGF and EGF induction in vitro. *Cytotechnology*. 2012; 64: 635-647.
- Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*. 1995; 346: 137-140.
- Teranda N, Hamazaki T, Oka M et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002; 416: 542-545.
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. 2000; 32: 11-16.
- Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells Dev*. 2010; 19: 513-522.
- Thirumala S, Wu X, Gimble JM et al. Evaluation of polyvinylpyrrolidone as a cryoprotectant for adipose tissue-derived adult stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010; 16: 783-792.
- Tokunaga A, Oya T, Ishii Y et al. PDGF receptor beta is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. *J Bone Miner Res*. 2008; 23: 1519-1528.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002; 105: 93-98.
- Torisawa YS, Mammoto T, Jiang E et al. Modeling Hematopoiesis and Responses to Radiation Countermeasures in a Bone Marrow-on-a-Chip. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016; 22: 509-515.
- Torisawa YS, Spina CS, Mammoto T et al. Bone marrow-on-a-chip replicates hematopoietic niche physiology in vitro. *Nat Methods*. 2014; 11: 663-669.
- Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M et al. A population of multipotent CD34- positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ. Res*. 2008; 102, 77-85.
- Tran N, Li Y, Maskali F et al. Short-term heart retention and distribution of intramyocardial delivered mesenchymal cells within necrotic or intact myocardium. *Cell Transplant*. 2006; 15: 351-358.
- Trosan P, Javorkova E, Zajicova A et al. The Supportive Role of Insulin-Like Growth Factor-I in the Differentiation of Murine Mesenchymal Stem Cells into Corneal-Like Cells. *Stem Cells Dev*. 2016; 25: 874-881.
- Tsai CC, Chen YJ, Yew TL et al. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood*. 2011; 117: 459-469.
- Tsai MS, Hwang SM, Chen KD, et al. Functional network analysis of the transcriptomes of mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid, amniotic membrane, cord blood, and bone marrow. *Stem Cells*. 2007; 25: 2511-2523.

- Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:413–419.
- Vaidya K, Kale V. Hematopoietic stem cells, their niche and the concept of co-culture systems: A critical review. *J Stem Cells*. 2015; 10: 13-31.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007; 9: 654-659.
- Valta MP, Hentunen T, Qu Q et al. Regulation of osteoblast differentiation: a novel function for fibroblast growth factor 8. *Endocrinology*. 2006; 147: 2171–2182.
- van den Bos C, Silverstetter S, Murphy M et al. p21(cip1) rescues human mesenchymal stem cells from apoptosis induced by low-density culture. *Cell Tissue Res*. 1998; 293: 463–470.
- Verdanova M, Pytlik R, Kalbacova MH. Evaluation of sericin as a fetal bovine serum-replacing cryoprotectant during freezing of human mesenchymal stromal cells and human osteoblast-like cells. *Biopreserv Biobank*. 2014; 12: 99-105.
- Veronesi F, Tschon M, Fini M. Gene Expression in Osteolysis: Review on the Identification of Altered Molecular Pathways in Preclinical and Clinical Studies. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(3). pii: E499. doi: 10.3390/ijms18030499.
- Vezzani B, Pierantozzi E, Sorrentino V. Not All Pericytes Are Born Equal: Pericytes from Human Adult Tissues Present Different Differentiation Properties. *Stem Cells Dev*. 2016 Aug 22. [Epub ahead of print].
- Via AG, Frizziero A, Oliva F. Biological properties of mesenchymal stem cells from different sources. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*. 2012; 2: 154-162.
- Villaron EM, Almeida J, López-Holgado N et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2004; 89: 1421-1427.
- Vollner F, Ernst W, Driemel O, Morszczec C. A two-step strategy for neuronal differentiation in vitro of human dental follicle cells. *Differentiation* 2009; 77: 433–441.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005; 33: 1402–1416.
- Wang G, Watanabe M, Imai Y et al. Genetic variations of Mrf-2/ARID5B confer risk of coronary atherosclerosis in the Japanese population. *Int Heart J*. 2008 May; 49: 313-327.
- Wang H, Leinwand LA, Anseth KS. Roles of transforming growth factor- $\beta$ 1 and OB-cadherin in porcine cardiac valve myofibroblast differentiation. *FASEB J*. 2014; 28: 4551-4562.
- Wang H, Pang B, Li Y et al. Dexamethasone has variable effects on

- mesenchymal stromal cells. *Cytherapy*. 2012; 14: 423-430.
- Wang J, Wang X, Sun Z et al. Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. *Stem Cells Dev*. 2010; 19: 1375–1383.
- Wang W, Jin P, Wang L et al. Impact of escaped bone marrow mesenchymal stromal cells on extracardiac organs after intramyocardial implantation in a rat myocardial infarction model. *Cell Transplant*. 2010; 19: 1599-1607.
- Wang W, Strecker S, Liu Y et al. Connective Tissue Growth Factor reporter mice label a subpopulation of mesenchymal progenitor cells that reside in the trabecular bone region. *Bone*. 2015; 71:76-88.
- Wang W, Zhuang H, Levitz CL et al. The increased level of PDGF-A contributes to the increased proliferation induced by mechanical stimulation in osteoblastic cells. *Biochem Mol Biol Int*. 1997; 43: 339-346.
- Wang Y, Chen X, Armstrong MA, Li G. Survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenotransplantation model. *J Orthop Res*. 2007; 25: 926–932.
- Ware JE Jr, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care*. 1992; 30: 473-483.
- Warn R, Harvey P, Warn A et al. HGF/SF induces mesothelial cell migration and proliferation by autocrine and paracrine pathways. *Exp Cell Res*. 2001; 267: 258-266.
- Warren SM, Nacamuli RK, Song HM, Longaker MT. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg*. 2004; 15: 34-37.
- Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010; 5(4): e10088. doi: 10.1371/journal.pone.0010088.
- Webber J, Clayton A. How pure are your vesicles? *J Extracell Vesicles*. 2013; 10: 2.
- Weiser B, Sommer F, Neubauer M et al. Ascorbic acid enhances adipogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cells Tissues Organs*. 2009; 189: 373-381.
- Wells JE, Howlett M, Cole CH, Kees UR. Deregulated expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is linked to poor outcome in human cancer. *Int J Cancer*. 2015; 137: 504-511.
- Winkler IG, Barbier V, Nowlan B, et al. Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat Med*. 2012; 18: 1651-1657.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61: 364–370.
- Xie JL, Bian HN, Qi SH et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF) alleviates the scar of the rabbit ear model in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;

16: 576-581.

- Yamakawa T, Sugimoto K, Whitson RH, Itakura K. Modulator recognition factor-2 regulates triglyceride metabolism in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391: 277-281.
- Yamanaka K, Yamamoto K, Sakai Y et al. Seeding of mesenchymal stem cells into inner part of interconnected porous biodegradable scaffold by a new method with a filter paper. *Dent Mater J.* 2015;34(1):78-85.
- Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, et al. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bonemarrow niche. *Cell.* 2011; 147: 1146-1158.
- Yanagawa T, Toba K, Suzuki T et al. Erythropoietin induces angiogenesis in a manner dependent on the intrinsic auto/paracrine production of interleukin-6 in vitro. *Int J Cardiol.* 2013; 168: 2941-2943.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000; 407: 242-248.
- Yang W, Tang H, Zhang Y et al. Meta-analysis followed by replication identifies loci in or near CDKN1B, TET3, CD80, DRAM1, and ARID5B as associated with systemic lupus erythematosus in Asians. *Am J Hum Genet.* 2013; 92: 41-51.
- Yang W, Treviño LR, Yang JJ et al. ARID5B SNP rs10821936 is associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in blacks and contributes to racial differences in leukemia incidence. *Leukemia.* 2010; 24: 894-896.
- Yang ZX, Han ZB, Ji YR et al. CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties. *PLoS One.* 2013; 8: e59354. doi: 10.1371/journal.pone.0059354.
- Yao Y, Song X, Cheng H et al. Dysfunction of bone marrow vascular niche in acute graft-versus-host disease after MHC-haploidentical bone marrow transplantation. *PLoS One.* 2014; 9: e104607. doi: 10.1371/journal.pone.0104607.
- Ye X, Yin X, Yang D et al. Ectopic bone regeneration by human bone marrow mononucleated cells, undifferentiated and osteogenically differentiated bone marrow mesenchymal stem cells in beta-tricalcium phosphate scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012; 18: 545-556.
- Yeo RW, Lai RC, Tan KH, Lim SK. Exosome: a novel and safer therapeutic refinement of mesenchymal stem cell. *Exosomes and Microvesicles.* 2013; 1: 7.
- Yin L, Zhu Y, Yang J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiated into hepatocyte-like cells in vivo and in vitro. *Mol Med Rep.* 2015 Mar;11(3):1722-32.
- Yin Z, Guo J, Wu TY et al. Stepwise Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Augments Tendon-Like Tissue Formation and Defect Repair In Vivo. *Stem Cells Transl Med.* 2016; 5: 1106-1116.
- Yong KW, Pingguan-Murphy B, Xu F et al. Phenotypic and functional characterization of long-term cryopreserved human adipose-derived stem

- cells. *Sci Rep.* 2015; 5: 9596.
- Yong KW, Wan Safwani WK, Xu F et al. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells for clinical applications: current methods and challenges. *Biopreserv Biobank.* 2015; 13: 231-239.
- Yoo SW, Chang DY, Lee HS et al. Immune following suppression mesenchymal stem cell transplantation in the ischemic brain is mediated by TGF- $\beta$ . *Neurobiol Dis.* 2013; 58: 249-257.
- Yoon E, Dhar S, Chun DE et al. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng.* 2007; 13: 619-627.
- Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res.* 2006; 66: 4795-4801.
- Zambelli A, Poggi G, Da Prada G et al. Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion. *Anticancer Res.* 1998; 18: 4705-4708.
- Zandstra PW, Coneally E, Petzer AL et al. Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94: 4698-4703.
- Zhang HT, Chen H, Zhao H et al. Neural stem cells differentiation ability of human umbilical cord mesenchymal stromal cells is not altered by cryopreservation. *Neurosci Lett.* 2011; 487: 118-122.
- Zhang JM, Feng FE, Wang QM et al. Platelet-Derived Growth Factor-BB Protects Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Derived From Immune Thrombocytopenia Patients Against Apoptosis and Senescence and Maintains MSC-Mediated Immunosuppression. *Stem Cells Transl Med.* 2016; 5: 1631-1643.
- Zhao M, Perry JM, Marshall H et al. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 2014; 20: 1321-1326.
- Zhou BO, Yue R, Murphy MM et al. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell.* 2014;15(2):154-168.
- Zhu H, Tamot B, Quinton M et al. Influence of tissue origins and external microenvironment on porcine foetal fibroblast growth, proliferative life span and genome stability. *Cell Prolif.* 2004; 37: 255-266.



## 9. Seznam příloh

### Příloha 1: Český a evropský patent

Patentový spis 301 148 z 18.11.2009. **Pytlík R**, Hoffman P, Stehlík D et al. Způsob kultivace mezenchymových kmenových buněk zejména kléčbě nehojících se fraktur, a bioreaktor k provádění tohoto způsobu.

Patentový spis EP 1 999 250 B1 z 20.7.2011. **Pytlík R**, Hofman P, Trč T et al. European patent specification. Method of cultivation of human mesenchymal stem cells, particularly for the treatment of non-healing fractures, and bioreactor for carrying out this cultivation method.

### Příloha 2: Kapitola v monografii

**Pytlík R**, Slanař O, Stehlík D, Matějková E. Production of clinical grade mesenchymal stromal cells. In: Eberli D (editor). Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials, pp. 145-178. Intech 2011, ISBN 978-953-307-663-8.

### Příloha 3: Publikované práce související s dizertační prací s IF

Penicka M, Horak J, Kobyłka P, **Pytlík R**, Kozak T, Belohlavek O, Lang O, Skalicka H, Simek S, Palecek T, Linhart A, Aschermann M, Widimsky P. Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction: a prematurely terminated randomized study. J Am Coll Cardiol. 2007; 49: 2373-4. **IF = 11.054** (2007).

Chochola M, **Pytlík R**, Kobyłka P, Skalická L, Kideryová L, Beran S, Varejka P, Jirát S, Křivánek J, Aschermann M, Linhart A. Autologous intra-arterial infusion of bone marrow mononuclear cells in patients with critical leg ischemia. Int Angiol. 2008; 27: 281-90. **IF = 1.148** (2008).

**Pytlík R**, Stehlík D, Soukup T, Kalbácová M, Rypáček F, Trc T, Mulinková K, Michnová P, Kideryová L, Zivný J, Klener P Jr, Veselá R, Trněný M, Klener P. The cultivation of human multipotent mesenchymal stromal cells in clinical grade medium for bone tissue engineering. Biomaterials. 2009; 30: 3415-27. **IF = 7.365** (2009).

Stehlík D, **Pytlík R**, Rychtrmocová H, Kideryová L, Veselá R, Kopečný Z, Trč T, Trněný M. Xenogeneic protein-free cultivation of mesenchymal stromal cells - towards clinical applications. Folia Biol (Praha). 2012; 58: 106-14. **IF = 1.219** (2012).

Verdanova M, **Pytlík R**, Kalbacova MH. Evaluation of sericin as a fetal bovine serum-replacing cryoprotectant during freezing of human mesenchymal stromal cells and human osteoblast-like cells. Biopreserv Biobank. 2014; 12: 99-105. **IF = 1.340** (2014).

**Pytlík R**, Rentsch C, Soukup T, Novotný L, Rentsch B, Kanderová V, Rychtrmocová H, Kalmárová M, Stehlík D, Trněný M, Slanař O. Efficacy and safety of human mesenchymal stromal cells in healing of critical-size bone defects in immunodeficient rats. *Physiol Res*. 2017; 66: 113-123. **IF = 1.643** (2015).

#### **Příloha 4. Publikované práce související s dizertační prací bez IF**

Novotová E, Strnadová H, Procházka B, **Pytlík R**. In vitro kultivace mezenchymových kmenových buněk u pacientů s lymfoidními malignitami. *Transfuze a hematologie dnes*. 2003; 9: 30-36.

Soukup T, Mokřý J, Karbanová J, **Pytlík R**, Suchomel P, Kucerová L. Mesenchymal stem cells isolated from the human bone marrow: cultivation, phenotypic analysis and changes in proliferation kinetics. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2006; 49: 27-33.

Stehlík D, **Pytlík R**, Rychtrmocová H et al. Současné použití MSC v regeneraci hyalinní chrupavky. *Ortopedie*. 2015; 9: 194-196.

Stehlík D, **Pytlík R**, Rychtrmocová H et al. Současné klinické použití MSC k regeneraci kostní tkáně. *Ortopedie*. 2015; 9: 198-202.

