

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tomislav Klanfar

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

Diplomski rad

Zagreb, 2010. godina

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

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UMNAŽANJE LJUDSKIH MEZENHIMSKIH MATIČNIH STANICA IN VITRO U PRISUSTVU LIZATA TROMBOCITA

Tomislav Klanfar

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

Mezenhimske matične stanice (MMS) su nekrvotvorne multipotentne matične stanice koje su od svih njihovih tkivnih izvora najzastupljenije u koštanoj srži (KS). MMS ispoljavaju imunomodulatorna svojstva *in vitro* što im daje potencijalnu primjenu u staničnoj terapiji. MMS su klinički primjenjive pri transplantacijama krvotvornih matičnih stanica i liječenju reakcije pesatka-protiv-primatelja. Uestalost MMS u KS vrlo je mala te ih je za potrebe kliničke primjene neophodno umnožiti *ex vivo*. Mi smo umnažali MMS *in vitro* u kultivacijskom mediju koji je bio oplemenjen s 10% ljudskog lizata trombocita (LT) tako izbjegavajući i upotrebu suplemenata životinjskog podrijetla. MMS su bile izolirane iz KS zdravih dobrovoljnih davatelja i uspješno uzgojene u mediju oplemenjenim s LT. Tijekom cijelog perioda uzgoja *in vitro*, stanice su ispoljavale mezenhimske karakteristike; prihvaćale su se na plastičnu podlogu, imale vretenasti fibroblastni oblik, ispoljavale imunofenotip mezenhimskih stanica i formirale fibroblastne kolonije. Ovi nalazi daju uporište za daljnja ispitivanja upotrebe LT u postupcima umnažanja MMS.

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

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

ključne riječi: mezenhimske matične stanice, lizat trombocita, koštana srž

Voditelj: dr.sc. Mirna Golemovi, znanstveni suradnik

Suvoditelj: dr.sc. Nada Oršoli, prof.

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

Rad prihvaćen: 30. lipnja 2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

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

Tomislav Klanfar

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

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

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

Thesis deposited in Central biological library

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

Supervisor: Mirna Golemovic, PhD

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

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

Thesis accepted: June 30 2010

Popis kratica

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

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Op e zna ajke mezenhimskih mati nih stanica	2
1.1.1. Morfologija	3
1.1.2. Imunofenotip	4
1.2. Klini ka primjena mezenhimskih mati nih stanica	4
1.2.1. Imunološka terapija	4
1.2.2. Regenerativna terapija	5
1.2.3. Genska terapija	5
1.3. Kultura mezenhimskih mati nih stanica <i>in vitro</i>	5
1.3.1. Uvjeti stani ne kulture <i>in vitro</i>	5
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	8
3. MATERIJAL I METODE	10
3.1. Stani ni uzorci i reagensije	11
3.1.1. Uzorci koštane srži	11
3.1.2. Reagensije	11
3.1.2.1. Lizat trombocita	11
3.1.2.2. Priprema kultivacijskog medija	11
3.2. Priprema stani ne suspenzije iz uzoraka koštane srži	12
3.2.1. Odre ivanje broja i vijabilnosti stanica u pripremljenim stani nim suspenzijama	12
3.2.2. Nasa ivanje stanica u kultivacijske flaskove	13
3.2.3. Promjena medija	13
3.2.4. Tripsinizacija	14
3.3. Test klonogenog potencijala mezenhimskih mati nih stanica	14
3.3.1. Postavljanje testa klonogenog potencijala mezenhimskih mati nih stanica	14
3.3.2. Kontrastno bojanje kolonija	15
3.4. Imunofenotipizacija	16
3.5. Obrada podataka	16
4. REZULTATI	18
4.1. Dobrovoljni davatelji koštane srži	19
4.2. Morfologija mezenhimskih mati nih stanica	19
4.3. Analiza rasta mezenhimskih mati nih stanica	20
4.4. Klonogeni potencijal mezenhimskih mati nih stanica	21

4.5. Imunofenotip uzgojenih mezenhimskih matičnih stanic <i>in vitro</i>	23
5. RASPRAVA	25
6. ZAKLJUČAK	28
7. LITERATURA	30

1. UVOD

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

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

1.1. Opće značajke mezenhimskih matičnih stanica-a

Mezenhimske matične stanice imaju sposobnost prihvaćanja za plastičnu površinu, izražavaju specifične površinske antigene i u specifičnim uvjetima rasta *in vitro* ispoljavaju sposobnost diferencijacije u bar tri stanične loze (osteoblasti, hondroblasti i adipociti) (2,5,6).

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

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

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

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

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

1.1.1. Morfologija

MMS u kulturi stanica *in vitro* prilikom prihvaćanja na plastičnu podlogu razvijaju vretenasti fibroblastni izgled.

Prilikom izvođenja CFU-F testa (*engl. colony forming unit-fibroblastoid*) koji se izvodi u svrhu ispitivanja klonogenog potencijala MMS, može se makroskopski primijetiti dvije vrste kolonija (1). Ta se razlika odražava u veličini rasta tih kolonija, a neposredno ovisi o morfološkoj stanici koje sačinjavaju pojedine kolonije.

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

1.1.2. Imunofenotip

MMS nemaju neke sebi svojstvene površinske biljege koji bi ih jednoznačno razlikovali od drugih sličnih stanica te se tek kombinacijom više biljega može zaključiti o tome da se radi o imunofenotipu MMS.

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

Na izražaj površinskih biljega i stoga nemogućnost njihove jednoznačne identifikacije uvelike utječe u tkivni izvor iz kojeg su izolirane MMS i značajke samog donora (prije svega njegova dob i zdravstveni status) (1,3).

1.2. Klinička primjena mezenhimskih matičnih stanica

Navedena imunomodulatorna svojstva MMS, mogu omogućiti jednostavnu izolaciju i uzgoj *in vitro* i MMS pogodnima za kliničku primjenu

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

1.2.1. Imunološka terapija

Do sada se najviše iskustva sakupilo u liječenju pacijenata kojima su transplantirane krvotvorne matične stanice (KMS). MMS u ko-kulturi s KMS mogu pospješiti efikasnost njihova rasta *in vitro* (3). Najčešće i na kliničke primjene MMS je ko-transplantacija s KMS (3). U takvim uvjetima svojom aktivnošću MMS mogu stvoriti povoljne uvjete za prihvatanje KMS i uspješnost repopulacije krvotvornog/imunološkog sustava primatelja. Osim toga prilikom alogene transplantacije KMS, MMS svojim imunomodulatornim svojstvima i uklanjanjem protu-upalnih citokina sprječavaju razvoj reakcije presatka-protiv-primatelja (GvHD).

1.2.2. Regenerativna terapija

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

I sama transplantacija koštane srži u pacijenata koji su prošli kroz opetovane cikluse citotoksične terapije zračenjem i kemoterapijom primjer je regeneracije koštane srži kojoj je svim tim postupcima prethodno teško narušena funkcija (1,3).

Lokalna primjena MMS također se pokazala uspješna u liječenju i regeneraciji kostiju, hrskvice i ligamenata (1), što je bazirano na multipotentnim svojstvima MMS. Također MMS nalaze svoju primjenu, za sada još uvijek u eksperimentalnim zahvatima, u liječenju infarkta srčanog mišića te u liječenju nekih autoimunih bolesti.

1.2.3. Genska terapija

Svojstvo MMS da djeluju imunomodulatorno i da se mobiliziraju u mjesta ozljede čini ih potencijalno iskoristive kao stanice-nosače koji sudjeluju u ispostavi djelotvornih lijekova ili izmjenjenog genetskog materijala na ciljano mjesto (1,3). Dokazano je da takve promijenjene MMS i u *in vitro* i *in vivo* modelima mogu producirati razne proteine kroz određeno vrijeme. Ovaj model nalazi primjenu u liječenju nasljednih bolesti i novonastalih oboljenja (1).

1.3. Kultura mezenhimskih matičnih stanica *in vitro*

1.3.1. Uvjeti stanice kulture *in vitro*

Zastupljenost MMS u koštanoj srži je 2-5 MMS u 10^6 mononuklearnih stanica (MNS) (1). Za primjenu MMS u terapijske svrhe, iz dosadašnjih iskustava se zaključilo da je potrebno transplantirati 2×10^6 MMS po kilogramu primatelja (2). Iz navedenog je očito da je MMS neophodno umnožiti *in vitro* kako bi u inkubatoru izvršile svoju funkciju prilikom transplantacije. Stoga je ključno kreirati protokol umnažanja MMS *in vitro* koji bi omogućio njihovo kvalitetno umnažanje u što kraćem vremenu, a da umnožene MMS zadrže sva svojstva neophodna za njihovu kliničku upotrebu.

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

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

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

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

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

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

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

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

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Stani ni uzorci i reagensije

3.1.1. Uzorci koštane srži

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

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

3.1.2. Reagensije

3.1.2.1. Lizat trombocita

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

3.1.2.2. Priprema kultivacijskog medija

Potrebni broj alikvota LT otopio se u vodenoj kupelji (WB-4 MS, Latvija) te se centrifugirao (Heraeus Omnifuge 2.0RS, Njemačka) na 3000 rpm/10 min. U sigurnosnom mikrobiološkom kabinetu, sterilnom špricom se izdvojio nadtalog iz centrifugiranog sadržaja i profiltrirao kroz filter za šprice veličine pora $0,22\mu\text{m}$ (TPP, Švicarska).

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

3.2. Priprema stani ne suspenzije iz uzoraka koštane srži

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Broj vijabilnih stanica u 1 ml stani ne suspenzije (C_{vi}) izračunao se po formuli:

$$C_{vi} = St \times V_i$$

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

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

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

3.2.2. Nasa ivanje stanica u kultivacijske flaskove

U kultivacijske flaskove (TPP, Švicarska) nasa ivale su se MNS u koncentraciji između 0,1-0,16x10⁶/cm². Stanice su se nasa ivale u flaskove površine 25 cm². Izračunata koncentracija stanica podesila se tako da se željeni broj stanica resuspendirao u ukupno 6 ml kultivacijskog medija, što je količina koja se nasa ivala u flask površine 25cm². Tako pripremljena stanica na suspenzija u kultivacijskom mediju prenijela se u flask pomoću sterilne serološke pipete.

Kultivacijski flask morao je biti prethodno označen imenom dobrovoljnog davatelja, gustoćom nasada stanica po cm² i datumom. Prije prijenosa flaskova u CO₂ inkubator dno mu se prebrisalo sterilnom kompresom namočenom dezinficijensom (Incidin Foam, Ecolab, Njemačka).

Flask s uzorkom je prenesen u CO₂ inkubator (HeraCell 150, Njemačka) u atmosferu s 5% CO₂ na 37°C.

3.2.3. Promjena medija

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

Iz CO₂ inkubatora izvadilo se flask te se pod invertnim mikroskopom provjerilo da li su se MNS adherirale. U sigurnosnom kabinetu, upotrebom serološke pipete izvukao se sav kultivacijski medij. Preostalom adheriranom sloju MNS dodalo se serološkom pipetom svježih 6 ml kultivacijskog medija koji je bio prethodno zagrijan u vodenoj kupelji. Flask se prebrisao kompresom navlaženom dezinficijensom te se vratio natrag u CO₂ inkubator.

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

3.2.4. Tripsinizacija

Nakon odre enog broja dana (~10 dana) , kad su stanice dosegnule konfluentnost od oko 80% bilo ih je potrebno odignuti od plasti ne podloge te u novom presa ivanju nasaditi u novi flask.

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

Novom sterilnom serološkom pipetom u flask se dodalo 3 ml Tripsin-EDTA otopine, flask se zatvorio i stavio u CO₂ inkubator na 2,5 – 3 minute. Po isteku inkubacije flask se izvadio iz CO₂ inkubatora te se provjerilo pod invertnim mikroskopom da li su se stanice u inkovito odvojile s plasti ne podloge. Djelovanje enzima se zatim brzo zaustavilo dodavanjem 5 ml PBS u flask. Sadržaj flaska se pipetom izvukao u novu sterilnu epruvetu te se dno još jednom lagano ispralo. Sadržaj epruvete se iscentrifugirao na 2300 rpm/3 min/RT.

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

U svakom sljede em presa ivanju, tripsinizacija je ra ena na jednak na in. Nakon prvog presa ivanja stanice su nasa ivane u gusto i 1000 st/cm² i ozna avane kao MMS.

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

3.3. Test klonogenog potencijala mezenhiskih mati nih stanica

3.3.1. Postavljanje testa klonogenog potencijala mezenhiskih mati ni stanica

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

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

Za potrebe CFU-F testa stanice su nasa ivane u koncentraciji od 2 MSC/cm² u dvije petrijeve zdjelice (TPP, Švicaska) površine 150 cm². To zna i da je potreban broj stanica koje su se nasa ivale bio 300 po jednoj petrijevoj zdjelici u volumenu od 10 ml kultivacijskog medija.

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

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

3.3.2. Kontrastno bojanje kolonija

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

Iz CO₂ inkubatora su se izvadile dvije petrijeve zdjelice te se pod invertnim mikroskopom provjeravalo stanje rastu ih kolonija. Nakon toga na radnome stolu su pripremljeni potrebni materijali za bojanje kolonija. Pripremljen je isti PBS, aceton (Merck, Njema ka) i etanol (Merck, Njema ka). U jednoj staklenoj boci pripremila se mješavina aceton – metanola u omjeru 3 : 2.

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

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

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

3.4. Imunofenotipizacija

Tijekom 2, 3. i 4. presa ivanja odre ivan je imunofenotip umnoženih stanica. Ukratko, nakon postupka tripsinizacije, stanice su isprane u istom PBS. Odre en je broj stanica u suspenziji i podešena koncentracija stanica na minimalno 1×10^6 st/ml. Slijede a protutijela su korištena u svrhu jednobojnog oznaavanja stanica: CD45-FITC (Dako, Danska), CD34-PE (BD, Njema ka), CD14-PE (Dako, Danska), HLA-DR-PE (Dako, Danska), CD90-FITC (BioLegend, SAD), CD105-FITC (BioLegend, SAD) i njima pripadaju e izotipske kontrole IgG1-FITC (Dako, Danska) i IgG2a-PE (Dako, Danska).

U ozna ene plasti ne tubice za proto nu citometriju dodano je po 10 μ l monoklonskog protutijela na koje se dodalo po 100 μ l stani ne suspenzije pripremljene u PBS-u. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Po isteku inkubacije, u svaku tubicu se dodalo po 2ml PBS, prodrmalno se sadržaj na drmalici te iscentrifugirao (2300rpm/3min) sa svrhom ispiranja suviška protutijela. Supernatant se potom dekantirao, a talog stanica resuspendirao u 0.3 ml PBS. Tako pripremljeni uzorci bili su spremni za propuštanje i analizu na proto nom citometru (FACSCalibur, BD, Njema ka).

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

3.5. Obrada podataka

Kako bi se izra unao rast stanica i udvostru enje populacija MMS u kultivacijskim flaskovima, prilikom svakog presa ivanja u obzir su se uzimala dva relevantna podatka koja su unesena u tablicu. Jedan je bio broj stanica koji je nasa en prilikom svakog presa ivanja (N_1), a drugi je bio broj stanica prikupljen prilikom tripsinizacije (N_H). Ti podatci uneseni su u formulu:

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

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

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

4. REZULTATI

4.1. Dobrovoljni davatelji koštane srži

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

Tablica 1: Dobrovoljni davatelji koštane srži

DD	spol	dob
1	m	23
2	ž	18
3	m	53

4.2. Morfologija mezenhimskih matičnih stanica

Mezenhimske matične stanice (MMS) uzgajane u CO₂ inkubatoru (Slika 1) adherirale su na plastičnu podlogu kultivacijskih flaskova. U svim fazama rasta uzgajane stanice su ispoljavale vretenastu fibroblastnu morfologiju karakterističnu za MMS uzgojene u kulturi stanica *in vitro* (Slika 2).



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



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

4.3. Analiza rasta mezenhimskih matičnih stanica

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

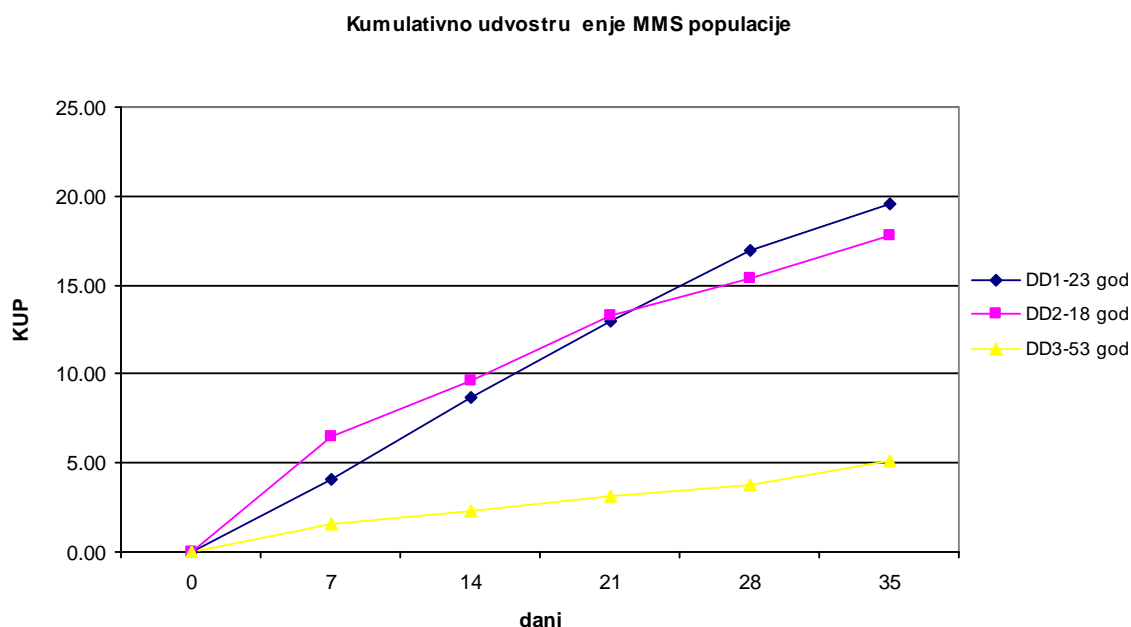
Tablica 2: Udvostručenje broja MMS prilikom uzgoja *in vitro*.

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

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

** zbrajaju se pojedinačna udvostručenja po svakom ciklusu presaivanja stanica

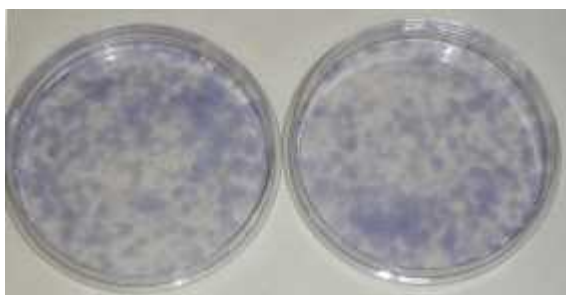
Tijekom 35 dana uzgoja MMS *in vitro*, stanice koje su potjecale od DD1 podvostru ile su se u broju 19.6 puta, stanice od DD2 17.8 puta i stanice DD3 5.13 puta. Iz dobivenih rezultata dalo se izra unati da je prosje no vrijeme potrebno za udvostru enje stani ne populacije u slu aju MMS-DD1 iznosilo 43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



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

4.4. Klonogeni potencijal mezenhimskih matirnih stanica

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



p1
CFU-F = 145



p2
CFU-F = 129



p3
CFU-F = 123



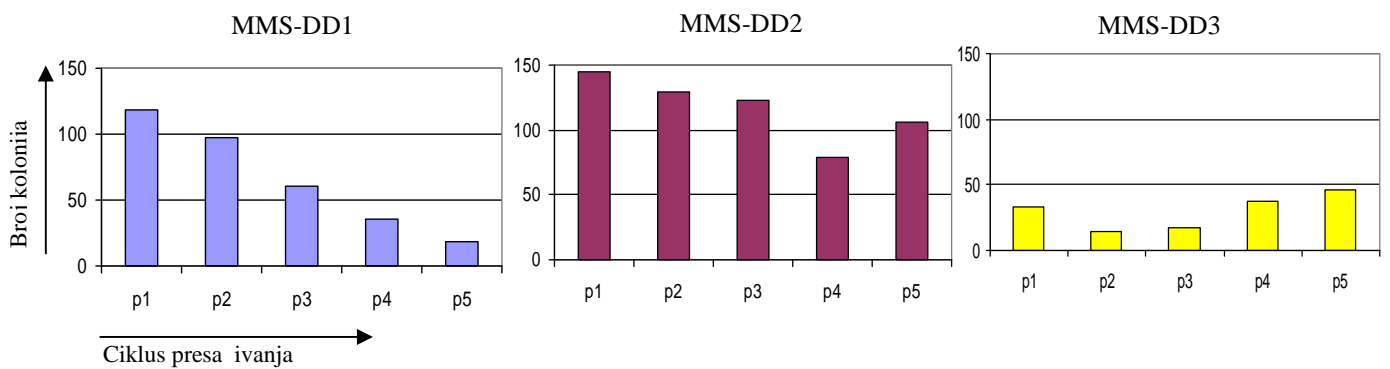
p4
CFU-F = 79



p5
CFU-F = 106

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

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

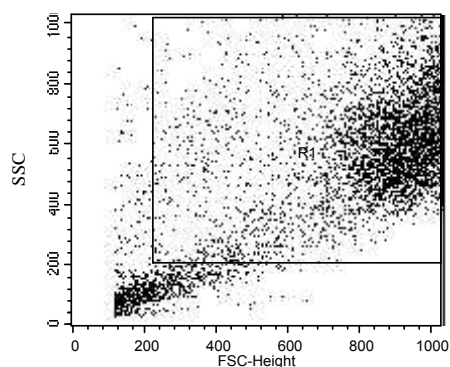


Slika 5. Broj kolonija MMS dobivenih u CFU-F testu u sva tri dobrovoljna davatelja.

4.5. Imunofenotip uzgojenih mezenhimskih matičnih stanica *in vitro*

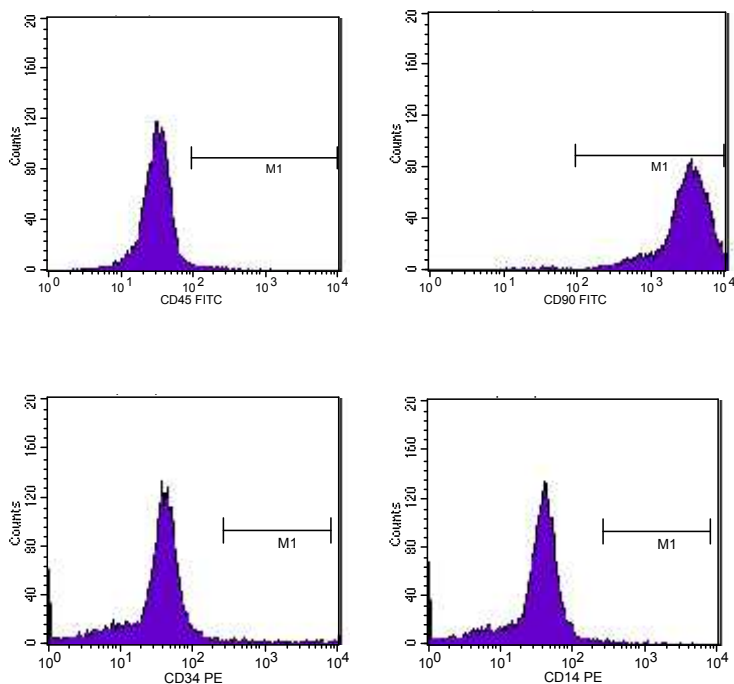
Imunofenotip uzgojenih MMS *in vitro* određivan je prilikom 2, 3. i 4. ciklusa presaivanja stanica. U tim fazama uzgoja stanica *in vitro* očekuje se homogenija stanica na populaciju što se, međutim, u ostalim značajkama, odražava i u njihovom imunofenotipu.

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



FSC

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



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

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

Tablica 3. Imunofenotip MMS dobrovoljnih davatelja u 2, 3. i 4. ciklusu presaivanja.

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

* Zbog tehničkih problema nije bilo moguće odrediti veličinu i broj biljega u MMS-DD1 staničnom uzorku.

5. RASPRAVA

Prilikom transplantacija raznih tkiva često dolazi do komplikacija koje se više ili manje uspješno liječe. Alogena transplantacija krvotvornim matičnim stanicama (KMS) je uhodana i standardna terapija u slučaju više hematoloških oboljenja. No, oporavak pacijenata nakon transplantacije ovisi o nekoliko čimbenika i potpun hematološki oporavak nije uvijek moguć. Uzrok slabe hematološke funkcije nakon transplantacije KMS je često povezan s pojavom infekcije citomegalovirusom i/ili reakcije presatka protiv primatelja (*GvHD*). Mnoge kliničke studije potvrdile su da MMS transplantirane kao auto- ili alotransplantat znatno olakšavaju prihvatanje primarnog transplantata te smanjuju učestalost nuspojava i komplikacija izazvanih u posttransplantacijskom razdoblju (1,9).

Iako MMS nalazimo u raznim tkivnim izvorima, do sada je najčešće korištena KS kao glavni tkivni izvor MMS u kliničkim studijama (2,7). Zastupljenost MMS u KS je samo 2-5 MMS u 10^6 mononuklearnih stanica (MNS) (2). Iz navedenog je očito da je MMS neophodno umnožiti *ex vivo* kako bi učinkovito izvršile svoju funkciju prilikom transplantacije. Stoga je potrebno kreirati protokol umnažanja MMS *in vitro* koji bi omogućio njihovo kvalitetno umnažanje u što kraćem vremenu, a da umnožene MMS zadrže sva svojstva neophodna za njihovu kliničku upotrebu.

U ovom radu, MMS su izolirane iz KS dobrovoljnih davatelja. Umnažane su u kultivacijskom mediju koji je bio oplemenjen s 10% lizata ljudskih trombocita (LT). Na taj način se nastojalo izbjeći upotrebu suplemenata životinjskog porijekla, poput fetalnog govećeg seruma, koji predstavljaju potencijalan rizik za prijenos stranih antigena i prionskih bolesti (4,5). U svim fazama uzgoja MMS su ispoljavale svoje karakteristične značajke; adherirale su za plastičnu površinu kultivacijskih flaskova, ispoljavale tipičnu vretenastu morfoloiju, ispoljavale imunofenotip karakterističan za MMS te u CFU-F testu polučile rastom fibroblastnih kolonija. Rast MMS različitih dobrovoljnih davatelja bio je obilježen različitom kinetikom kroz 5 ciklusa presaivanja. Stanični uzorci MMS-DD1 i MMS-DD2 tijekom 35 dana uzgoja *in vitro* polučili su značajno boljim rastom stanica u usporedbi s MMS-DD3. Tako se stanica populacija MMS-DD1 tijekom tog perioda 19,6 puta udvostručila, a prosječno vrijeme potrebno za podvostručavanje stanica je iznosilo 43 sata. U slučaju MMS-DD2, situacija je bila slična, stanice su 17,8 udvostručile svoj broj, a prosječno vrijeme udvostručavanja je iznosilo 47 sati. Dobrovoljni davatelji DD1 i DD2 bili su stari 23 i 18 godina. U slučaju stanica koje su potjecale od najstarijeg dobrovoljnog davatelja DD3 (53 godine), tijekom 35 dana uzgoja,

stanice su se udvostruile samo 5,1 puta, a za jedan ciklus udvostručenja bilo im je potrebno prosječno 164 sati, tj. 7 dana.

Isti trend kinetike rasta MMS uzoraka potvrđen je i CFU-F testom. Dok MMS-DD1 i MMS-DD2 uzorci najviše i broj fibroblastnih kolonija polučuju u najranijim ciklusima presaivanja (p1 i p2), MMS-DD3 daje lagani porast kolonija tek u 5. ciklusu presaivanja. S obzirom da su najranije faze rasta klinički značajne i potencijalno upotrebljive za transplantaciju, na primjeru ova tri dobrovoljna davatelja može se vidjeti kako biološka raznolikost, u ovom slučaju starosna dob davatelja, utječe na rezultat umnažanja MMS *in vitro* (8,10).

S obzirom da su stanice sva tri davatelja u svim fazama rasta ispoljavale imunofenotip i morfologiju MMS, ta razlika se nije odrazilala na karakteristikama MMS već samo na kinetici rasta koja je ključan faktor u slučajevima kada je potrebno u kratkom vremenu umnožiti što više i broj MMS za potrebe transplantacije.

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

6. ZAKLJUČAK

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

7. LITERATURA

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

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