Umnažanje ljudskih mezenhimskih matičnih stanica in vitro u prisustvu lizata trombcita

Klanfar, Tomislav

Master's thesis / Diplomski rad

2010

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

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

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tomislav Klanfar

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

Diplomski rad

Zagreb, 2010. godina

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

Zahvaljujem se mentorici diplomskog rada dr. sc. Mirni Golemović na strpljenju, organizaciji i vođenju izrade ovog diplomskog rada, dipl. ing. Marijani Škifić na pomoći i savjetima pri izvedbi eksperimentalnih dijelova rada, te ostalom osoblju Zavoda za transfuzijsku medicinu i staničnu tarapiju 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 TROMBCITA

Tomislav Klanfar

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

Mezenhimske matične stanice (MMS) su nekrvotvorne mltipotentne 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 primjenjivne pri transplantacijama krvotvornih matičnih stanica i liječenju reacije pesatka-protiv-primatelja. Učestalost 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 upotrebu suplemenata životinjskog podrijetla. MMS su bile izolirane iz KS zdravih dobrovoljnh davatelja i uspješno uzgojene u mediju oplemenjenim s LT. Tijekom cijelog perioda uzgoja *in vitro*, stanice su ispoljavale mezenhimske karakteristike; prihvaćale su se na plastčnu podlogu, imalevretenasti 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 Golemović, znanstveni suradnik
Suvoditelj: dr.sc. Nada Oršolić, prof.
Ocjenitelji: dr.sc. Mirna Golemović, dr.sc. Nada Oršolić, prof., dr.sc. Maja Matulić, doc., dr.sc. Perica Mustafić, doc., dr.sc. Zoran Tadić,doc.
Rad prihvaćen: 30.lipnja 2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagrebu
Faculty of Science
Department of Biology Graduation Thesis

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

Tomislav Klanfar

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

Mesenchymal stem cells (MSCs) are nonhematopoietic multipotent stem cells mainly residin in the bone marrow (BM). MSCs show immunomodulatory properties *in vitro* that make them intersting in the field of cellular therapy. MSCs have ben 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 plateet lysate (PL) thus avoiding standard use of animal origin supplements. MSCs isolated from BM samples of healthy donors were sucessfully cultured in medium containing PL. During propagation period of 35 days, MSCs continuously expressed mesenchymal characteristics: they adhered to plastic surface shoing typical firoblastod shape, they expressed mesenchymal immunophenotype and formed fibroblast colonies. These findings give basis for further efforts in evaluating use f PL i MSCs expansion methods.

(32 pages, 7 figures, 3 tables, 10 references, original in: croatian)
Thesis deposited in Central biological library
Key words: mesenchymal stem cells, platelet lysate, bone marrow
Supervisor: Mirna Golemovic, PhD
Co-Supervisor: dr. Nada Orsolic, Prof.,
Reviewers: Mirna Golemovic, PhD., dr. Nada Orsolic, Prof., dr. Maja Matulic, Asst. Prof., dr. Perica Mustafic, Asst. Prof., dr. Zoran Tadic, Asst. Prof.
Thesis accepted: June 30 2010

Popis kratica

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

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1.Opće značajke mezenhimskih matičnih stanica 2
1.1.1. Morfologija 3
1.1.2. Imunofenotip 4
1.2. Klinička primjena mezenhimskih matičnih stanica 4
1.2.1. Imunološka terapija 4
1.2.2. Regenerativna terapija 5
1.2.3. Genska terapija 5
1.3. Kultura mezenhimskih matičnih stanica *in vitro* 5
1.3.1. Uvjeti stanične kulture *in vitro* 5
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 8
3. MATERIJAL I METODE 10
3.1. Stanični uzorci i reagencije 11
3.1.1. Uzorci koštane srži 11
3.1.2. Reagencije 11
3.1.2.1. Lizat trombocita 11
3.1.2.2. Priprema kultivacijskog medija 11
3.2. Priprema stanične suspenzije iz uzoraka koštane srži 12
3.2.1. Određivanje broja i vijabilnosti stanica u pripremljenim staničnim suspenzijama 12
3.2.2. Nasađivanje stanica u kultivacijske flaskove 13
3.2.3. Promjena medija 13
3.2.4. Tripsinizacija 14
3.3. Test klonogenog potencijala mezenhimskih matičnih stanica 14
3.3.1. Postavljanje testa klonogenog potencijala mezenhimskih matičnih 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 matičnih stanica 19
4.3. Analiza rasta mezenhimskih matičnih stanica 20
4.4. Klonogeni potencijal mezenhimskih matičnih stanica 21

4.5. Imunofenotip uzgojenih mezenhimskih matičnih stanica *in vitro* 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 svaranja 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 kćeri. 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 mikrookruženje 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 započelo 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 koštan srži (KS), krvi iz pupkovine, periferne krvi, masnog tkiva, kosti, mišića, hrskavice, jetre, kože, slezene, timične žlijezde, amnionske tekućine i placente (1,3,5). Iako se sve te MMS međusobno razlikuju, bilo morfološki i/ili fenotipski sve one u određenim uvjetima uzgoja *in vitro* pokazuju svojstva tipičnih MMS.

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

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

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

MMS ne izražavaju kostimulatorne molekule na svojoj površini pa stoga niti ne mogu djelovati kao antigen-prezentirajuće stanice (1). To njihovo svojstvo te opažanja da u miješanoj reakciji limfocita snizuju T-stanični odgovor (3) čini MMS vrlo interesantnima u području kliničke transplantacije. Pri alogenim transplantacijama koštane srži moguća je pojava reakcije presatka-protiv-primatelja (*engl. graft vs. host disease; GvHD*) koja ponekada može imati i fatalan ishod po primatelja. U takvim situacijama ko-transplantacija MMS i njihov imunomodulatoran 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 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 formig unit-fibroblastoid*) koji se izvodi u svrhu ispitivanja klonogenog potencijala MMS, može se makroskopski primijetiti dvije vrste kolonija (1). Ta se razlika očituje u veličini rastućih kolonija, a neposredno ovisi o morfologiji stanica 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 predominantne stanice tipa I sve su rjeđe te se omjer stanica tipa I i II mijenja u korist stanica tipa II. Vjeruje se da tip II nastaje iz MMS tipa I asimetričnom 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 protočne 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 utječu 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, mogućnost jednostavne izolacije i uzgoja *in vitro* čine 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). Najčešći način kliničke primjene MMS je ko-transplantacija s KMS (3). U takvim uvjetima svojom aktivnošću MMS mogu stvoriti povoljne uvjete za prihvačanje KMS i uspješnost repopulacije krvotvornog/imunološkog sustava primatelja. Osim toga prilikom alogene transplantacije KMS, MMS svojim imunomodulatornim svojstvima i lučenjem 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 citotoksičnih terapija zračenjem i kemoterapijom primjer je regeneracije koštane srži kojoj je svim tim postupcima prethodno tesko 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). Dokazno je da takve promijenjene MMS i u *in vitro* i *in vivo* modelima mogu producirati razne proteine kroz određeno vrijeme. Ovaj model nalazi moguću primjenu u liječenju naslijednih bolesti i novonastalih oboljenja (1).

1.3. Kultura mezenhimskih matičnih stanica *in vitro*

1.3.1. Uvjeti stanične 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 x 10^6 MMS po kilogramu primatelja (2). Iz navedenog je očito da je MMS neophodno umnožiti *in vitro* kako bi učinkovito 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 njihov klinički učinak.

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

S pomoću testa CFU-F moguće je pratiti klonogeni potencijal MMS uzgojenih u različitim uzgojnim uvjetima. Danas se zna da se među čimbenike koji mogu znatno utjecati na proliferativni kapacitet MMS *in vitro*, svakako ubrajaju trombocitni čimbenik rasta (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB), epidermalni čimbenik rasta (epidermal growth factor, EGF), fibroblastni čimbenik rasta (basic fibroblast growth factor, bFGF), transformirajući čimbenik rasta β (transforming growth factor β, TGF- β) i inzulinski čimbenik rasta (insuli-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 promjena stanica, pojačanim stvaranjem stresnih vlakana i skraćivanjem telomera izazvanih replikativnim starenjem (3) te je optimizacija kuture stanica *in vitro* neophodna u svakoj instituciji/laboratoriju u kojem se one uzgajaju.

Ključan čimbenik u optimizaciji uvjeta kulture *in vitro* jest izbor animalnog seruma koji je glavni izvor čimbenika rasta stanica (aminokiseline, minerali, lipidi, transportni proteini, čimbenici 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 čimbenika rasta u medij nije se pokazalo kao pouzdan način standardizacije i optimizacije uvjeta rasta stanica. Sve su to razlozi koju su na kraju rezultirali idejom da se kreiraju uvjeti rasta u kojima će se izbjeći dodatak FGS. Kako se i ovom problemu pristupalo s više strana, tako su i tu dobiveni različiti rezltati, dijelom i zbog korištenih serumskih komponenti kao što je BSA ili visokih koncentracija čimbenika rasta korištenih u eksperimentima (1). Stoga se s vremenom odustalo od te ideje i u većini slučajeva se ostalo pri upotrebi FGS.

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

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

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

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

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

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Stanični uzorci i reagencije

3.1.1. Uzorci koštane srži

Korišteni su uzorci koštane srži (KS) od 3 zdrava davatelja koji su dali informirani pristanak za doniranje malog volumena KS za istraživanje. Centrifugiranjem u gradijentu gustoće fikola (Amersham BioSci, Velika Britanija) iz uzorka KS izdvojen je međusloj 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. Reagencije

3.1.2.1. Lizat trombocita

Pripravci trombocita dobrovoljnih davatelja krvi prikupljeni i pripremljeni u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu korišteni su za pripremu lizata trombocita (LT). LT se koristio kao dodatak hranjivom mediju korištenom za uzgoj MMS. LT pripravljan je tako da se 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 stanični sadržaj. Takav LT se potom centrifugirao na 2300rpm /RT/30 min. Nadtalog se rastočio 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 0,22μm (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 stanične suspenzije iz uzoraka koštane srži

3.2.1. Određivanje broja i vijabilnosti stanica u pripremljenim staničnim 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.

Čista i suha Bürker-Türkova komorica s pokrovnim stakalcem očistila se alkoholom i osušila staničevinom. 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 stanične suspenzije izdvojio se sterilno u sigurnosnom kabinetu za potrebe brojanja pod svjetlosnim mikroskopom. Jednaki volumen stanične suspnzije i tripanskog modrila (Fluka, Njemačka) se pomiješao i pipetom prenjeo u komoricu za brojanje. Na isti način se pripremila i mješavina stanične suspenzije i Türkove otopine (Kemika,Hrvatska) koja se prenjela u drugi dio komorice.

Bürker-Türkova komorica se namjestila na stolić 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 =Vi) prema formuli:

Vi = broj živih stanica / ukupan broj stanica x 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 stanične suspenzije dobio se prema formuli:

St = Broj prebrojanih stanica na N polja / N x 2 x 250 x 1000

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

Cvi = St x Vi

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

Uk. br st. = Cvi x Volumen suspenzije

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

3.2.2. Nasađivanje stanica u kultivacijske flaskove

U kultivacijske flaskove (TPP, Švicarska) nasađivale su se MNS u koncentraciji između 0,1-0,16x10^6/cm^2. Stanice su se nasađivale u flaskove površine 25 cm^2. Izračunata koncentracija stanica podesila se tako da se željeni broj stanica resuspendirao u ukupno 6 ml kultivacijskog medija, što je količina koja se nasađivala u flask površine 25cm^2. Tako pripremljena stanična suspenzija u kultivacijskom mediju prenjela se u flask pomoću sterilne serološke pipete.

Kultivacijski flask morao je biti prethodno označen imenom dobrovoljnog davatelja, gustoćom nasada stanica po cm^2 i datumom. Prije prijenosa flaskova u CO_2 inkubator dno mu se prebrisalo sterilnom kompresom namočenom dezinficijensom (Incidin Foam, Ecolab, Njemačka).

Flask s uzorkom je prenese u CO_2 inkubator (HeraCell 150, Njemačka) u atmosferu s 5% CO_2 na 37°C.

3.2.3. Promjena medija

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

Iz CO_2 inkubatora izvadio se flask te se pod invertnim mikroskopom provjerilo da li su se MNS adherirale. U sigurnosnom kabinetu, upotrebom serološke pipete izvukao se sav kultivacijski medij. Preostalom adheriranom sloju MNS dodalo se serološkom pipetom svježih 6 ml kultivacijskog medija koji je bio prethodno zagrijan u vodenoj kupelji. Flask se prebrisao kompresom navlaženom dezinficijensom te se vratio natrag u CO_2 inkubator.

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

3.2.4. Tripsinizacija

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

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

Novom sterilnom serološkom pipetom u flask se dodalo 3 ml Tripsin-EDTA otopine, flask se zatvorio i stavio u CO_2 inkubator na 2,5 – 3 minute. Po isteku inkubacije flask se izvadio iz CO_2 inkubatora te se provjerilo pod invertnim mikroskopom da li su se stanice učinkovito odvojile s plastične podloge. Djelovanje enzima se zatim brzo zaustavilo dodavanjem 5 ml PBS u flask. Sadržaj flaska se pipetom izvukao u novu sterilnu epruvetu te se dno još jednom lagano ispralo. Sadržaj epruvete se iscentrifugirao na 2300 rpm/3 min/RT.

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

U svakom sljedećem presađivanju, tripsinizacija je rađena na jednak način. Nakon prvog presađivanja stanice su nasađivane u gustoći 1000 st/cm^2 i označavane kao MMS.

Nakon prvog presađivanja postupak tripsinizacije se radio svaki 7. dan.

3.3. Test klonogenog potencijala mezenhiskih matičnih stanica

3.3.1. Postavljanje testa klonogenog potencijala mezenhimskih matični 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 nasađivanjem MMS u flaskove bilo je potrebno postaviti i CFU-F test.

Za potrebe CFU-F testa stanice su nasađivane u koncentraciji od 2 MSC/cm^2 u dvije petrijeve zdjelice (TPP, Švicaska) površine 150 cm2. To znači da je potreban broj stanica koje su se nasađivale 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 odgovarajući volumen stanične suspenzije koja je sadržavala 600 stanica. Pripremljena stanična suspenzija za CFU-F test dobro se promiješala sterilnom serološkom pipetom te se njome sav sadržaj prebacivao i jednakomjerno razdijeljivao u 2 pripremljene i prethodno označene 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 plastično dno petrijevih zdjelica su brojane. Ovaj dio testa se nije izvodio u sterilnim uvjetima.

Iz CO_2 inkubatora su se izvadile dvije petrijeve zdjelice te se pod invertnim mikroskopom provjeravalo stanje rastućih kolonija. Nakon toga na radnome stolu su pripremljeni potrebni materijali za bojanje kolonija. Pripremljen je čisti PBS, aceton (Merck, Njemačka) i etanol (Merck, Njemačka). 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, Njemačka) koja se pustila da djeluje 10 – 12 min. Boja se zatim odlila, a zdjelice se lagano, ali što temeljitije ispirale pod tekućom 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 označavala markerom kako ne bi došlo do zabune pri brojanju. Nakon što su prebrojane sve kolonije

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

3.4. Imunofenotipizacija

Tijekom 2, 3. i 4. presađivanja određivan je imunofenotip umnoženih stanica. Ukratko, nakon postupka tripsinizacije, stanice su isprane u čistom PBS. Određen je broj stanica u suspenziji i podešena koncentracija stanica na minimalno $1x10^6$st/ml. Slijedeća protutijela su korištena u svrhu jednobojnog označavanja stanica: CD45-FITC (Dako, Danska), CD34-PE (BD, Njemačka), CD14-PE (Dako, Danska), HLA-DR-PE (Dako, Danska), CD90-FITC (BioLegend, SAD), CD105-FITC (BioLegend, SAD) i njima pripadajuće izotipske kontrole IgG1-FITC (Dako, Danska) i IgG2a-PE (Dako, Danska).

U označene plastične tubice za protočnu citometriju dodano je po 10 μl monoklonskog protutijela na koje se dodalo po 100μl stanične suspenzije pripremljene u PBS-u. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Po isteku inkubacije, u svaku tubicu se dodalo po 2ml PBS, prodrmalo se sadržaj na 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 protočnom citometru (FACSCalibur, BD, Njemačka).

Pri analizi, na prikazu propuštenog uzorka stavila se ograda oko populacije mezenhimskih stanica te se unutar te ograde analizirao udio stanica koje su vezale specifična protutijela. Pozitivitet od 20% na više se smatrao pozitivnim nalazom. Podešenja prilikom propuštanja obilježenih uzoraka kroz protočni 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 crvenonarančastom spektru). Dobiveni rezultati analizirani su računalnim programom CellQuest (BD, Njemačka).

3.5. Obrada podataka

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

$$\mathbf{X = [\log10(N_H) - \log10(N_1)] / \log10(2)}$$

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

Srednje vrijednosti broja kolonija MMS prilikom svakog presađivanja, 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 godne (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 CO_2 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 presađivanja MMS svakog DD. Rast MMS prije svakog ciklusa presađivanja bio je ograničen na 7 dana kada je dosegnuta prosječna konfluentnost stanica oko 80%. Rezultati povećanja broja stanica na kraju svakog ciklusa presađivanja za svaki uzorak MMS pojedinačno su navedeni u Tablici 2 te je izračunat ukupan broj podvostručenja tijekom vremenskog perioda obuhvaćenog s 5 ciklusa presađivanja stanica.

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

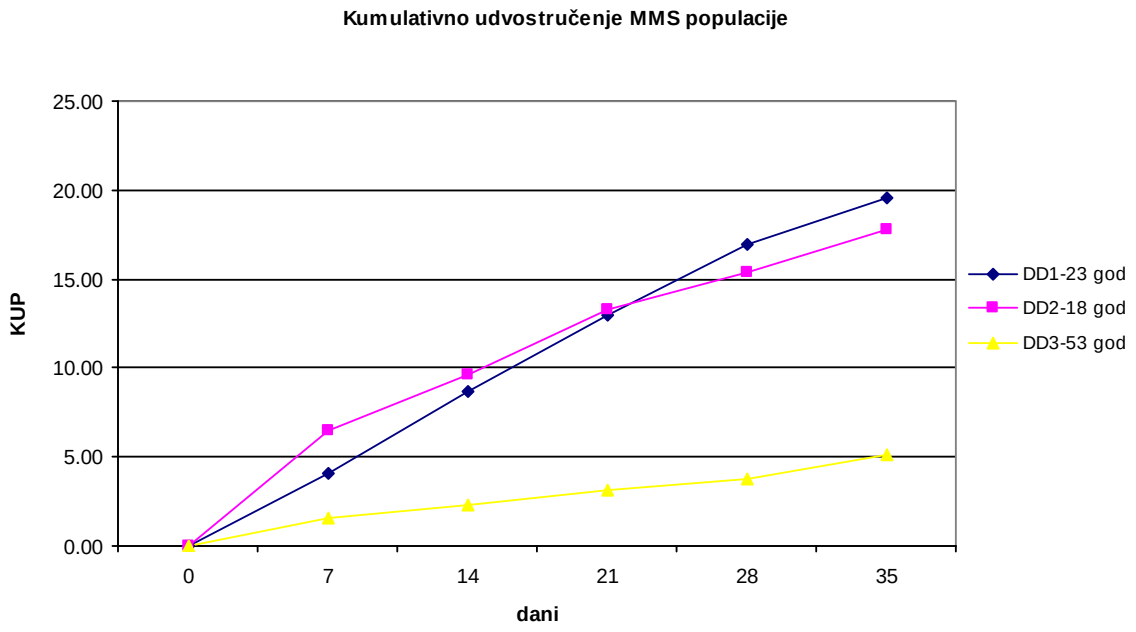
Ciklus presađivanja stanica / broj dana uzgoja in vitro	**Dobrovoljni davatelj 1**		**Dobrovoljni davatelj 2**		**Dobrovoljni davatelj 3**	
	Udvostručenje stanične populacije *	**Kumulativno udvostručenje stanične populacije****	**Udvostručenje stanične populacije ***	**Kumulativno udvostručenje stanične populacije****	**Udvostručenje stanične populacije ***	**Kumulativno udvostručenje stanične 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=(log10(Nh)-log10(N1))/log10(2)

** zbrajaju se pojedinačna udvostručenja po svakom ciklusu presađivanja stanica

Tijekom 35 dana uzgoja MMS *in vitro*, stanice koje su potjecale od DD1 podvostručile su se u broju 19.6 puta, stanice od DD2 17.8 puta i stanice DD3 5.13 puta. Iz dobivenih rezultata dalo se izračunati da je prosječno vrijeme potrebno za udvostručenje stanične populacije u slučaju MMS-DD1 iznosilo 43 sata, MMS-DD2 47 sati i u slučaju MMS-DD3 164 sata.

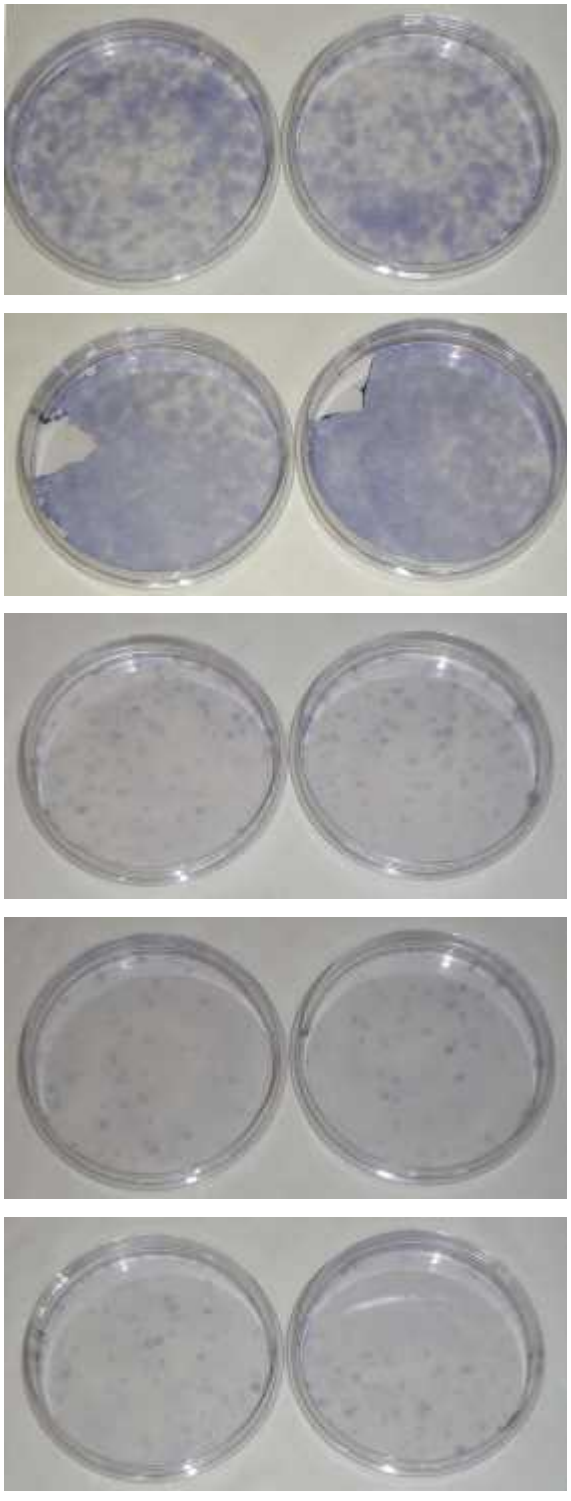
Iz dobivenih rezultata rasta vrlo je uočljiva razlika kinetike rasta broja stanica koje su potjecale od mlađih dobrovoljnih davatelja u odnosu na stanice podrijetlom od najstarijeg dobrovoljnog davatelja (MMS-DD3) (Slika 3).



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

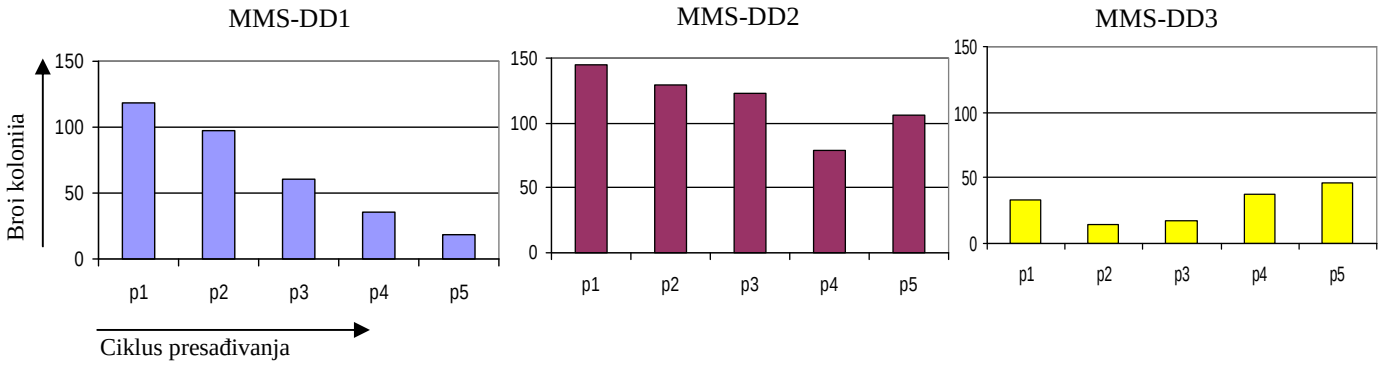
4.4. Klonogeni potencijal mezenhimskih matičnih stanica

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



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

Iz pojedinačnih 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 presađivanja.

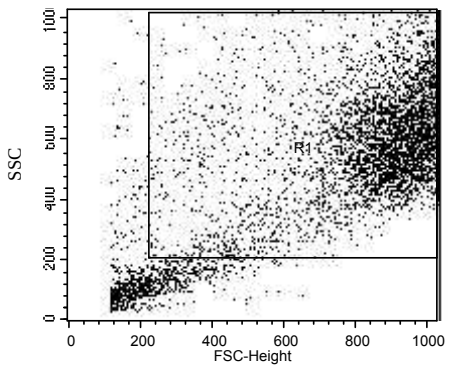


Slika 5. Broj kolonija MMS dobivenih u CFU-F testu u sva tri dobrovoljna davatelja.

4.5. Imunofenotip uzgojenih mezenhimskih matičnih stanica *in vitro*

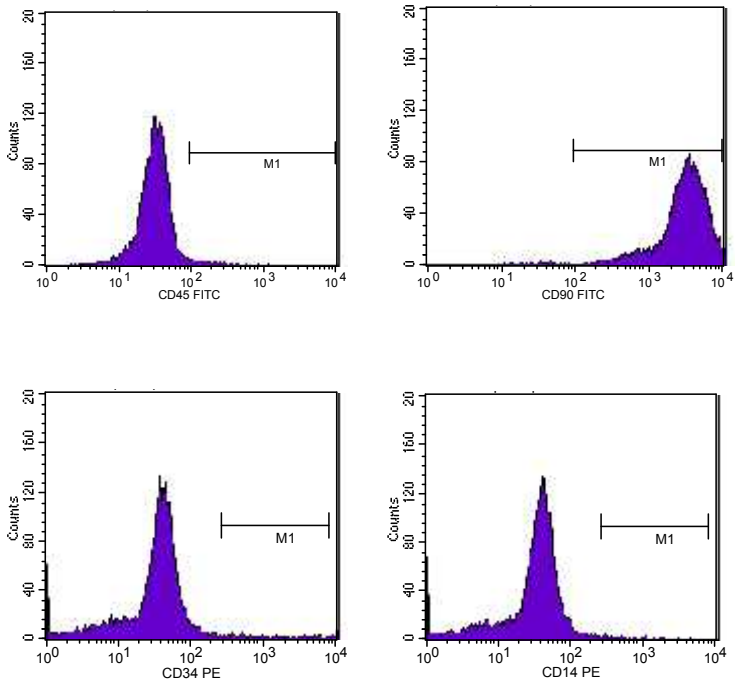
Imunofenotip uzgojenih MMS *in vitro* određivan je prilikom 2, 3. i 4. ciklusa presađivanja stanica. U tim fazama uzgoja stanica *in vitro* očekuje se homogenija stanična populacija što se, među ostalim značajkama, očituje i u njihovom imunofenotipu.

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



FSC

Slika 6. Protočnocitometrijski 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 presađivanja 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 presađivanja.

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

* Zbog tehničkih problema nije bilo moguće odrediti veći broj biljega u MMS-DD1 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 slučaj. 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 prihvaćanje primarnog transpantata 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 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 njihov klinički učinak.

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 goveđeg 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 morfologiju, 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 presađivanja. 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 stanična populacija MMS-DD1 tijekom tog perioda 19,6 puta udvostručila, a prosječno vrijeme potrebno za podvostručenje stanica je iznosilo 43 sata. U slučaju MMS-DD2, situacija je bila slična, stanice su 17,8 udvostručile svoj broj, a prosječno vrjeme udvostručenja 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 udvostručile 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 najveći broj fibroblastnih kolonija polučuju u najranijim ciklusima presađivanja (p2 i p2), MMS-DD3 daje lagani porast kolonija tek u 5. ciklusu presađivanja. S obzirom da su najranije faze rasta klinički značajne i potencijalno upotrebljive za transplantaciju, na primjeru ova tri dobrovoljna davatelja očito je 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 očitovala na karakteristikama MMS već samo na kinetici rasta koja je ključan čimbenik u slučajevima kada je potrebno u kratkom vremenu umnožiti što veći 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 moguće je uspješno umnožiti MMS.

- U svim fazama uzgoja MMS su ispoljavale svoje karakteristične značajke; adherirale su za plastičnu površinu kultivacijskih flaskova, ispoljavale tipičnu vretenastu morfologiju, ispoljavale imunofenotip karakterističan za MMS te u CFU-F testu polučile rastom fibroblastnih kolonija.

- Rast MMS različitih dobrovoljnih davatelja bio je obilježen različitom kinetikom što je mouće povezati sa starosnom dobi dobrovoljnih davatelja. Kako su najranije faze rasta klinički značajne i potencijalno upotrebljive za transplantaciju, na primjeru ova tri dobrovoljna davatelja očito je kako biološka raznolikost, u ovom slučaju starosna dob davatelja, utječe na rezultat umnažanja MMS *in vitro*.

7. LITERATURA

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

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