

# Biološke značajke mezenhimskih matičnih stanica umnoženih in vitro u mediju s lizatom ljudskih trombocita

---

Škifić, Marijana

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:051328>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marijana Škifić**

**Biološke značajke mezenhimskih  
matičnih stanica umnoženih *in vitro* u  
mediju s lizatom ljudskih trombocita**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2019.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Marijana Škifić**

**Biološke značajke mezenhimskih  
matičnih stanica umnoženih *in vitro* u  
mediju s lizatom ljudskih trombocita**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2019.

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelji istraživanja: prof.dr.sc. Radovan Vrhovac

dr. sc. Mirna Golemović, dipl.ing., znanstveni suradnik

Zahvaljujem prim.dr.sc. Branki Golubić Ćepulić, predstojnici Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, na podršci u izradi ovog rada.

Svim djelatnicima Zavoda za hematologiju hvala na susretljivosti i pomoći u prikupljanju uzoraka.

Posebno zahvaljujem i svim djelatnicima Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju koji su mi svojim savjetima pomogli u brojnim nedoumicama.

Najviše se zahvaljujem mentorima prof.dr.sc. Radovanu Vrhovcu i dr.sc. Mirni Golemović na neizmornoj pomoći, strpljenju i poticanju te razumijevanju i korisnim savjetima tijekom izrade ovog rada.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Otkriće i povijest istraživanja MMS .....	1
1.2. Tkivni izvori MMS .....	2
1.3. Kriteriji za definiranje MMS.....	3
1.4. Imunološka svojstva MMS .....	3
1.4.1. Učinak MMS na limfocite T .....	5
1.4.2. Učinak MMS na dendritičke stanice .....	6
1.4.3. Učinak MMS na limfocite B .....	6
1.4.4. Učinak MMS na stanice NK .....	6
1.4.5. Uloga Toll-like receptora u polarizaciji MMS .....	7
1.5. Fiziološka uloga MMS u reguliranju hematopoeze i popravku oštećenog tkiva.....	9
1.6. Klinička primjena MMS umnoženih <i>in vitro</i> .....	10
1.6.1. Prihvat presatka KMS i potpora hematopoezi.....	11
1.6.2. Bolest presatka protiv primatelja.....	12
1.6.3. Koštane bolesti .....	13
1.6.4. Multipla skleroza.....	13
1.6.5. Kardiovaskularne bolesti.....	14
1.6.6. Ozljede mozga i leđne moždine .....	14
1.6.7. Opekline uzrokovane radioaktivnim zračenjem.....	15
1.6.8. Klinička primjena genetički izmijenjenih MMS.....	16
1.7. Uzgoj MMS u kulturi <i>in vitro</i> .....	16
1.7.1. Fetalni goveđi serum .....	17
1.7.2. Ljudski serum .....	18
1.7.3. Trombinom aktivirana plazma bogata trombocitima .....	19
1.7.4. Lizat trombocita .....	19
2. HIPOTEZA .....	22
3. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA.....	23
4. MATERIJALI I METODE .....	24
4.1. Ispitanici .....	24

4.2. Materijali .....	24
4.2.1. Koncentrati trombocita.....	24
4.2.2. Periferna krv .....	24
4.3. Metode.....	25
4.3.1. Priprema lizata ljudskih trombocita .....	25
4.3.2. Priprema medija za uzgoj MMS.....	25
4.3.3. Izolacija MNS.....	25
4.3.4. Određivanje vijabilnosti i koncentracije stanica tehnikom svjetlosne mikroskopije.....	25
4.3.5. Zamrzavanje MNS izoliranih iz KS .....	26
4.3.6. Uzgoj stanica u kulturi <i>in vitro</i> .....	27
4.3.7. Praćenje kinetike rasta MMS umnoženih <i>in vitro</i> .....	27
4.3.8. Analiza imunofenotipa MMS tehnikom protočne citometrije .....	28
4.3.9. Test ispitivanja klonogenog potencijala MMS.....	29
4.3.10. Test ispitivanja multipotentnosti MMS.....	29
4.3.11. Citogenetska analiza kariotipa MMS .....	30
4.3.12. Kemiluminiscencijski imunotest za određivanje proliferacije limfocita potaknute mitogenom u prisustvu MMS .....	31
4.3.13. Statistička obrada podataka .....	33
5. REZULTATI .....	34
5.1. Morfološke značajke MMS uzgajanih <i>in vitro</i> .....	34
5.2. Kinetika rasta umnoženih MMS .....	34
5.3. Analiza imunofenotipa MMS umnoženih <i>in vitro</i> .....	40
5.4. Klonogeni potencijal MMS umnoženih <i>in vitro</i> .....	43
5.5. Diferencijacija MMS uzgojenih <i>in vitro</i> .....	44
5.6. Analiza kariotipa MMS umnoženih <i>in vitro</i> .....	46
5.7. Imunomodulatorna svojstva MMS umnoženih <i>in vitro</i> .....	49
6. RASPRAVA.....	53
7. ZAKLJUČCI .....	62
8. SAŽETAK.....	63
9. SUMMARY .....	64
10. LITERATURA.....	65
11. ŽIVOTOPIS .....	78

## POPIS KRATICA

ADP – adenzin difosfat, prema engl. *adenosine diphosphate*

autoHS – autologi ljudski serum, prema engl. *autologous human serum*

aGvHD – akutna bolest presatka protiv primatelja, prema engl. *acute graft versus host disease*

aloHS – alogeni ljudski serum, prema engl. *allogeneic human serum*

$\alpha$ -MEM –  $\alpha$ -modificirani minimalni esencijalni medij

ATP – adenzin trifosfat, prema engl. *adenosine triphosphate*

BC – trombocitno-leukocitni međusloj, prema engl. *buffy coat*

BDNF – neurotrofički čimbenik podrijetlom iz mozga, prema engl. *brain-derived neurotrophic factor*

bFGF – bazični fibroblastni čimbenik rasta, prema engl. *basic fibroblast growth factor*

BMP – koštani morfogenetski protein, prema engl. *bone morphogenetic protein*

BrdU – 5-bromo-2'-deoksiuridin

C – komplement, prema engl. *complement*

CD – stanični diferencijacijski biljeg, prema engl. *cluster of differentiation*

CFU-F – stanica sa svojstvom stvaranja fibroblastnih kolonija, prema engl. *colony forming unit-fibroblast*

cGvHD – kronična bolest presatka protiv primatelja, prema engl. *chronic graft versus host disease*

CPD – kumulativno udvostručenje stanične populacije, prema engl. *cumulative population doubling*

CTGF – čimbenik rasta vezivnog tkiva, prema engl. *connective tissue growth factor*

CTL - citotoksični limfociti T, prema engl. *cytotoxic T lymphocytes*

CCR – receptor za kemokinski ligand s motivom C-C

CXCL – kemokinski ligand s motivom C-X-C

CXCR – receptor za kemokinski ligand s motivom C-X-C

DMSO – dimetil sulfoksid

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

RNK – dvolančana ribonukleinska kiselina

EGF – epidermalni čimbenik rasta, prema engl. *epidermal growth factor*

ELISA – enzimski imunotest, prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

FBS – fetalni goveđi serum, prema engl. *fetal bovine serum*

FCFC – stanica sa svojstvom stvaranja fibroblastnih kolonija, prema engl. *fibroblastic colony-forming cell*

FISH – fluorescencijska hibridizacija *in situ*, prema engl. *fluorescence in situ hybridization*

FITC – fluorescein izotiocijanat prema engl. *fluorescein isothiocyanate*

GvHD – bolest presatka protiv primatelja, prema engl. *graft versus host disease*

GvL – presadak protiv leukemije, prema engl. *graft versus leukemia*

GMP – dobra proizvođačka praksa, prema engl. *good manufacturing practice*

HGF – hepatocitni čimbenik rasta, prema engl. *hepatic growth factor*

HLA – antigen glavnog sustava tkivne histokompatibilnosti, prema engl. *Human Leucocyte Antigen*

HO – hemoksigenaza

HS – ljudski serum, prema engl. *human serum*

IBMX – 3-izobutil-1-metilksantin, prema engl. *3-isobutyl-1-methylxanthine*

IDO – indolamin-2,3-dioksigenaza

Ig – imunoglobulin



IGF-1 – inzulinu sličan čimbenik rasta, prema engl. *insulin-like growth factor-1*

IL – interleukin

INF- $\gamma$  – interferon  $\gamma$

ISCN – Međunarodni sustav za nomenklaturu u humanoj citogenetici, prema engl. *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*

ISCT – Međunarodno društvo za staničnu terapiju, prema engl. *International Society for Cellular Therapy*

IU – međunarodne jedinice, prema engl. *international units*

KMS – krvotvorne matične stanice

KS – koštana srž

LPS – lipopolisaharid

LT – lizat trombocita

MCP-1 – čimbenik privlačenja monocita 1, prema engl. *monocyte chemoattractant protein-1*

MCP-3 – čimbenik privlačenja monocita 3, prema engl. *monocyte chemoattractant protein-3*

M-CSF – čimbenik rasta makrofagnih kolonija, prema engl. *macrophage colony stimulating factor*

MIP-1 $\alpha$  – makrofagni upalni protein 1 $\alpha$ , prema engl. *macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$*

MIP-1 $\beta$  – makrofagni upalni protein 1 $\beta$ , prema engl. *macrophage inflammatory protein 1 $\beta$*

MMP – metaloproteinaze matriksa, prema engl. *matrix metalloproteinase*

MMS – mezenhimske matične stanice

MNS – mononuklearne stanice

MS – multipla skleroza

NAP-2 – protein 2 aktivacije neutrofila, prema engl. *neutrophil-activating protein-2*

NIH – Nacionalni institut za zdravlje, prema engl. *National Institut of Health*

NK stanice – prirodno ubilačke stanice, prema engl. *natural killer cells*

NO – dušikov oksid

OI – osteogenesis imperfecta

PAI-1 – inhibitor 1 aktivatora plazminogena, prema engl. *plasminogen activator inhibitor-1*

PBS – fiziološka otopina puferirana fosfatima, prema engl. *phosphate buffered saline*

PD – broj udvostručenja stanične populacije, prema engl. *population doubling*

PD1 – protein programirane stanične smrti 1, prema engl. *programmed cell death protein 1*

PDGF – čimbenik rasta trombocita, prema engl. *platelet derived growth factor*

PDL1 – ligand proteina programirane stanične smrti 1, prema engl. *programmed cell death protein 1 ligand*

PDT – vrijeme potrebno za jedno udvostručenje stanične populacije, prema engl. *population doubling time*

PE – fikoeritrin, prema engl. *phycoerythrin*

PF4 – trombocitni čimbenik 4, prema engl. *platelet factor 4*

PGE2 – prostaglandin E2

PHA – fitohemaglutinin

PK – periferna krv

PRP – plazma bogata trombocitima, prema engl. *platelet rich plasma*

RANTES – selektivni čimbenik privlačenja monocita i limfocita T u područja s upalnom reakcijom, prema engl. *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*

RPM – broj okretaja u minuti, prema engl. *rotation per minute*

RPMI – medij za uzgoj stanica RPMI, prema engl. *Roswell Park Memorial Institute 1640*

SD – standardna devijacija

SDF-1 $\alpha$  – čimbenik stromalnih stanica 1 $\alpha$ , prema engl. *stromal cell-derived factor-1 $\alpha$*

SE – standardna pogreška aritmetičke sredine, prema engl. *standard error of mean*

SŽS – središnji živčani sustav

TGF- $\beta$  – transformirajući čimbenik rasta  $\beta$ , prema engl. *transforming growth factor  $\beta$*

Th limfociti – pomoćnički limfociti T, prema engl. *T helper lymphocytes*

TLR – receptor nalik na Toll, prema engl. *Toll-like receptor*

TNF- $\alpha$  – čimbenik nekroze tumora  $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$*

TFPI – inhibitor puta tkivnog čimbenika, prema engl. *tissue factor pathway inhibitor*

TIMP – tkivni inhibitor metaloproteinaza, prema engl. *tissue inhibitor of metalloproteinases*

tPRP – trombinom aktivirana plazma bogata trombocitima, prema engl. *thrombin-activated platelet rich plasma*

TT – tjelesna težina

VEGF – čimbenik rasta krvožilnog endotela, prema engl. *vascular endothelial growth factor*

# 1. UVOD

Mezenhimske matične stanice (MMS) su nekrvotvorne multipotentne stanice koje imaju svojstvo samoobnavljanja te sposobnost da se nakon lokalnog podražaja diferenciraju u različita tkiva mezodermalnog podrijetla. Osim u različitim fetalnim tkivima, MMS se nalaze i u gotovo svim postnatalnim tkivima te ih se stoga svrstava u skupinu adultnih matičnih stanica. Najbolje je poznata uloga MMS u koštanoj srži (KS), gdje stvaranjem različitih prekursorskih stanica te lučenjem čimbenika rasta i proteina matriksa sačinjavaju stromalni mikrookoliš ključan za regulaciju procesa hematopoeze (1). Perivaskularni smještaj MMS u različitim tkivima ukazuje na njihovu fiziološku ulogu u organizmu te se smatra da takvim položajem osiguravaju zalihu stanica u slučaju potrebe za popravkom tkiva, istovremeno doprinoseći tkivnoj i imunološkoj homeostazi (2). Zahvaljujući mogućnosti migriranja u tkiva zahvaćena upalom ili oštećenjem, MMS mogu doprijeti do mjesta ozljede te svojim parakrinim djelovanjem potaknuti proces angiogeneze, spriječiti nastanak ožiljaka, te modulirati imunološke procese (3). Zbog navedenih svojstava MMS mogu imati terapijsko djelovanje u stanjima u kojima je narušena imunološka homeostaza zbog čega je njihovo istraživanje potaknulo veliki interes u znanstvenoj zajednici.

## 1.1. Otkriće i povijest istraživanja MMS

Prije više od 150 godina njemački patolog Cohnheim je prvi postavio hipotezu o postojanju nekrvotvornih stanica u KS koje krvotokom migriraju do mjesta ozljede i sudjeluju u procesu cijeljenja (4). Najveći doprinos daljnjem istraživanju stromalnih stanica dala je grupa predvođena Friedensteinom koja je 1974. godine objavila rezultate niza eksperimenata na ljudskim i životinjskim stanicama izoliranim iz KS i slezene (5). U spomenutom istraživanju uzorci KS su pohranjeni u plastične petrijeve posude iz kojih su nakon 4 sata uklonjene neadherirane stanice. Preostala populacija adheriranih stanica bila je heterogena, no većinom sastavljena od stanica vretenastog oblika. Nakon 3-5 dana u kulturi *in vitro*, na plastičnoj površini petrijeve posude nastao je sloj stanica koji je nakon 10-14 dana sadržavao na tisuće stanica. Nakon 1-2 ciklusa presađivanja udio raznih staničnih vrsta, poput primjerice makrofaga, je značajno opao te je stvorena homogenija populacija stanica nalik fibroblastima. Također je primijećeno da prilikom nasada u niskoj koncentraciji, te iste stanice iz KS imaju sposobnost formiranja kolonija pa su stoga nazvane FCFC (*engl. fibroblastic colony-forming cell*), a kasnije preimenovane u CFU-F (*engl. colony forming unit-fibroblast*). Friedenstein je, ujedno, ispitao i *in vivo* funkciju stromalnih stanica KS transplantirajući ih u bubrežnu kapsulu zamoraca što je rezultiralo stvaranjem koštanog tkiva na mjestu implantacije. Takvo

otkriće je bilo u skladu s rezultatima ranijih ispitivanja u kojima su se stromalne stanice miša u kulturi *in vitro* diferencirale u malene depozite kosti ili hrskavice (6, 7). Friedensteinova opažanja su tijekom 80-tih godina 20. stoljeća potvrđena istraživanjima drugih grupa znanstvenika, a pojam „mezenhimska matična stanica“ je 1991. godine uveo Caplan kako bi naglasio njihovu sposobnost diferencijacije u tkiva mezodermalnog podrijetla kao što su kost, hrskavica, tetive, ligamenti, mišići, masno tkivo i stroma KS (8). No, s obzirom da sve stanice s morfologijom nalik fibroblastima i svojstvom adhezije za plastičnu podlogu ne iskazuju sva biološka svojstva matičnih stanica, Međunarodno društvo za staničnu terapiju (*engl. International Society for Cellular Therapy*, ISCT) je 2005. godine predložilo da se za ove stanice koristi naziv „multipotentne mezenhimske stromalne stanice“. Istovremeno se naziv „mezenhimske matične stanice“ i dalje može koristiti za one stanice koje iskazuju jasno definirane kriterije za identifikaciju matičnih stanica (9).

## **1.2. Tkivni izvori MMS**

Povijesno gledano glavni tkivni izvor MMS predstavlja KS, u kojoj je njihova fiziološka uloga u reguliranju procesa hematopoeze i najbolje poznata (7, 10). No, do danas su MMS izolirane iz gotovo svih organa i tkiva odraslog organizma poput masnog tkiva (11), mišića (12), hrskavice (13), kože (14), dentalne pulpe (15), periostija (16), sinovijske membrane (17), periferne krvi (18) te slezene, timusa i stijenke aorte (19). Osim toga, MMS su izolirane i iz perinatalnih tkiva poput pupčane vrpce (20), krvi iz pupkovine (21), posteljice (22) i amnijske tekućine (23, 24) kao i iz fetalne KS, periferne krvi, jetre, pluća, slezene (25, 26) i bubrega (27). Iako stanice izolirane iz različitih tkivnih izvora iskazuju zajedničke osnovne značajke MMS, među njima postoje razlike u pogledu diferencijacijskog potencijala, izražaja antigena te imunomodulatornih svojstava (28). In't Anker i suradnici su pokazali da MMS izolirane iz fetalne slezene imaju značajno manji potencijal diferencijacije u adipocite u odnosu na MMS izolirane iz fetalne KS, jetre i pluća. S druge strane, MMS iz fetalne jetre pokazuju manji osteogenetski potencijal u odnosu na MMS izolirane iz drugih fetalnih tkiva (26). Utjecaj MMS na stanice imunološkog sustava također ovisi o tkivnom izvoru iz kojeg potječu. Pokazano je da MMS izolirane iz masnog tkiva imaju snažniji utjecaj na diferencijaciju dendritičkih stanica u odnosu na MMS iz KS. Istovremeno, MMS iz krvi iz pupkovine učinkovitije smanjuju efektorsku funkciju dendritičkih stanica u odnosu na MMS izolirane iz KS (29). U kokulturi MMS i krvotvornih stanica pozitivnih na biljeg CD34, uočeno je da populacija umnoženih CD34+ stanica sadrži veći udio nezrelijih (primitivnijih) stanica nakon uzgoja u prisustvu MMS izoliranih iz KS ili krvi iz pupkovine, nego tijekom

uzgoja u prisustvu MMS iz masnog tkiva (30). Smatra se da je razlog tomu jači izražaj adhezijskih molekula poput kadherina i integrina na MMS iz KS i krvi iz pupkovine nego na MMS iz masnog tkiva te da adhezijske molekule doprinose uspostavi međustaničnog kontakta MMS s nediferenciranim krvotvornim progenitorima (31).

### 1.3. Kriteriji za definiranje MMS

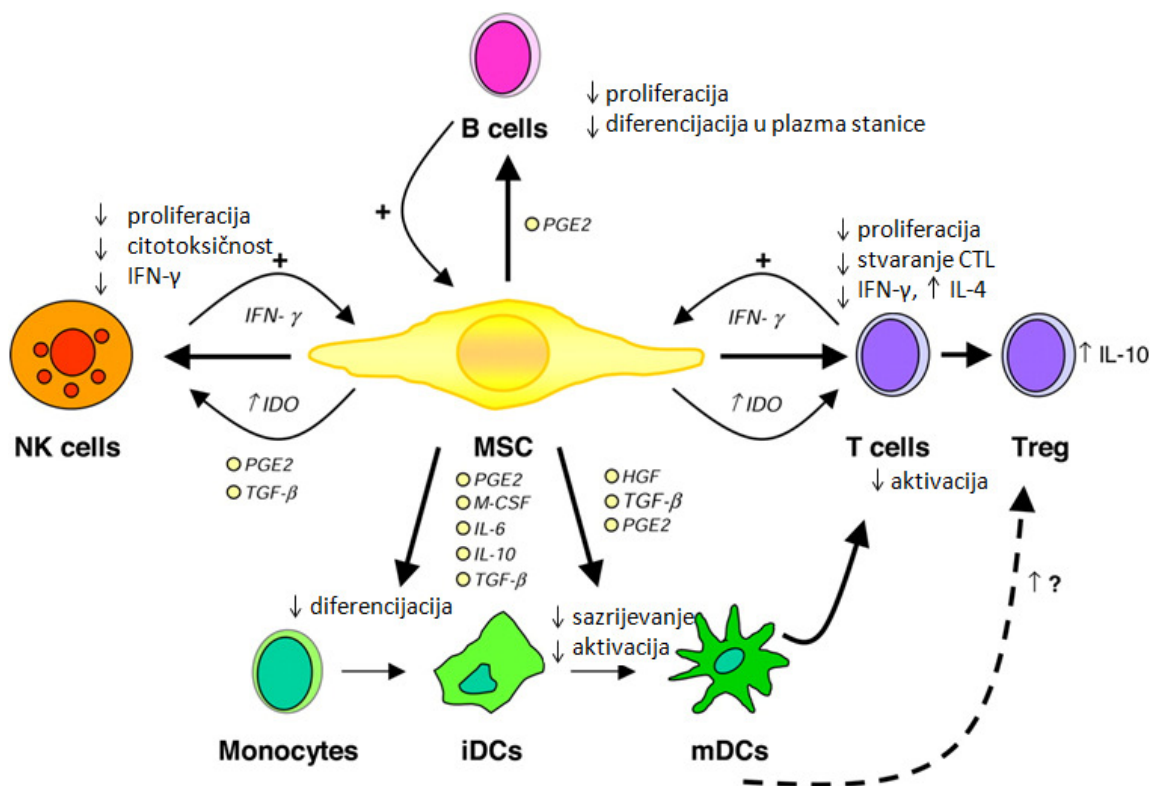
S obzirom na veliki terapijski potencijal MMS, broj laboratorija u kojima se one uzgajaju posljednjih je dvadesetak godina intenzivno rastao što je rezultiralo velikim brojem publikacija u navedenom području. Pritom su istraživačke skupine koristile različite tkivne izvore i metode izolacije MMS, a velike su varijabilnosti postojale i u uzgojnim uvjetima tijekom umnažanja MMS u kulturi *in vitro*. Zbog ovakvih razlika u metodologiji postavilo se pitanje da li su biološka svojstva i klinički učinci staničnih populacija umnoženih u različitim laboratorijima uopće usporedivi i da li je uistinu riječ o istoj vrsti stanica. U kontekstu rastućeg broja kliničkih istraživanja temeljenih na primjeni MMS, bilo je nužno bolje definirati MMS te standardizirati istraživanje u ovom području. Stoga je Radna skupina za mezenhimske i tkivne matične stanice pri ISCT 2006. godine objavila sljedeće minimalne kriterije za definiranje MMS umnoženih *in vitro* (32).

- (1) stanice moraju adherirati za plastičnu podlogu uzgojne posude
- (2) stanice moraju izražavati specifičan imunofenotip;  $\geq 95\%$  stanica mora izražavati CD105, CD73 i CD90) i ne izražavati antigene krvotvornih stanica ( $\leq 2\%$  stanica smije izražavati CD45, CD34, CD14 ili CD11b, CD79 $\alpha$  ili CD19 te molekule HLA razreda II)
- (3) stanice moraju imati multipotentni diferencijacijski potencijal (sposobnost diferencijacije u adipocite, osteoblaste i hondrocite u uvjetima *in vitro*).

### 1.4. Imunološka svojstva MMS

Interes šire znanstvene zajednice za MMS uslijedio je nakon otkrića njihovih jedinstvenih imunoloških svojstava. Naime, MMS karakterizira slab izražaj molekula razreda I glavnog sustava tkivne histokompatibilnosti (*engl. Human Leucocyte Antigen, HLA*), kao i izostanak izražaja molekula HLA razreda II i kostimulatornih molekula (CD40, CD40L, CD80, CD86). Ovakav imunofenotip čini MMS hipoinmunogenima, što znači da mogu predočiti antigen u sklopu molekula HLA razreda I, no zbog izostanka kostimulatornih molekula, takav podražaj ostavlja limfocite T u stanju anergije (33). Nadalje, izražaj molekula HLA razreda I, iako slab, štiti MMS od djelovanja alogenih stanica NK, dok zahvaljujući izostanku molekula HLA razreda II izbjegavaju imunološko prepoznavanje od strane alogenih CD4<sup>+</sup> limfocita T (34).

Zanimljivo je da u prisustvu interferona  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) MMS značajno povećavaju izražaj molekula HLA razreda I i II, no čak ni tada ne izazivaju imunološki odgovor alogenih limfocita T zbog izostanka sekundarnog signala za kojeg su neophodne kostimulatorne molekule (35). Zbog navedenih svojstava, MMS se smatraju imunoprivilegiranim stanicama te se mogu transplantirati u HLA-nepodudarnog primatelja bez izazivanja imunološke reakcije. Konačno, osim svojstava hipoinmunogenosti i imunoprivilegiraniosti, MMS posjeduju i imunomodulatorna svojstva. Poznato je da MMS utječu na lokalnu imunološku reakciju djelujući na niz stanica imunološkog sustava uključujući limfocite T, stanice NK, limfocite B te monocite i dendritičke stanice (36). Svoje imunomodulatorne učinke MMS ostvaruju parakrinim djelovanjem i izravnim međustaničnim kontaktom (Slika 1). U prisustvu proupalnih citokina poput čimbenika nekroze tumora  $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) i INF- $\gamma$ , MMS luče topive čimbenike kojih je danas poznato više od trideset. Među njima najvažniju ulogu imaju transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ), hepatocitni čimbenik rasta (engl. *hepatic growth factor*, HGF), indolamin-2,3-dioksigenaza (IDO), prostaglandin E2 (PGE2), dušikov oksid (NO) i hemoksigenaza (HO) (34).



Slika 1. Imunomodulatorni učinci MMS. Prilagođeno prema Nauta A, Fibbe W. *Blood*. 2007;110:3499-3506.

#### **1.4.1. Učinak MMS na limfocite T**

Di Nicola i suradnici su 2002. godine dokazali da dodatak MMS snizuje proliferaciju limfocita T koja nastaje u miješanoj reakciji limfocita (*engl. mixed lymphocyte reaction, MLR*), kao i u prisustvu poliklonalnih aktivatora, poput mitogena ili interleukina 2 (IL-2) (37). Pritom MMS ne izazivaju apoptozu limfocita T, već uzrokuju arrest u G0/G1 fazi njihovog staničnog ciklusa (38). Stanični i molekularni mehanizmi kojima MMS suprimiraju proliferaciju limfocita T uključuju lučenje topivih čimbenika, izravni međustanični kontakt te poticanje stvaranja regulatornih limfocita T (34). U ljudskim stanicama je najbolje poznat mehanizam djelovanja topivog čimbenika IDO koji potiče razgradnju triptofana u kinurenin i druge katabolite, a oni potom suprimiraju proliferaciju CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita T, te potiču diferencijaciju regulatornih limfocita T (39). Di Nicola i suradnici su, u ranije spomenutom istraživanju, pokazali da je za smanjenje proliferacije limfocita T dovoljno lučenje topivih čimbenika, no da se supresivni učinak višestruko povećava u slučaju izravnog međustaničnog kontakta između limfocita T i MMS (37). Naime, nakon aktivacije s INF- $\gamma$ , MMS na svojoj površini počinju izražavati specifične adhezijske molekule. Među njima je najznačajniji ligand PDL1 (*engl. programmed cell death protein 1 ligand*) koji se s velikim afinitetom veže na protein PD1 (*engl. programmed cell death protein 1*) na površini limfocita T. Ovakva adhezija MMS na limfocite T rezultira supresijom T-stanične proliferacije i sprječavanjem njihove efektorske funkcije (40). Konačno, MMS doprinose supresiji proliferacije limfocita T i poticanjem diferencijacije subpopulacije limfocita poznate pod nazivom regulatorni limfociti T. Njihov imunofenotip (CD4+CD25+FoxP3+) je odgovoran za supresiju proliferacije alogenih stanica, prvenstveno efektorskih limfocita T i dendritičkih stanica čime regulatorni limfociti T stvaraju protuupalno okruženje. MMS potiču diferencijaciju regulatornih limfocita T lučenjem PGE2 i TGF- $\beta$  (41), a u daljnjem tijeku imunološke reakcije stvaraju i HLA-G, netipičnu molekulu HLA razreda I, čime se populacija regulatornih limfocita T dodatno povećava i doprinosi lokalnom imunosupresivnom učinku (42, 43).

#### **1.4.2. Učinak MMS na dendritičke stanice**

Dendritičke stanice su antigen predočujuće stanice koje mogu potaknuti imunološki odgovor i posredovati između urođene i stečene komponente imunološkog sustava (36). No, poznato je da se u prisustvu MMS procesi diferencijacije i sazrijevanja dendritičkih stanica narušavaju. Naime, MMS potiču diferencijaciju monocita u CD1a+ dendritičke stanice koje ne izražavaju kostimulatorne molekule CD80 i CD86 i nisu sposobne aktivirati limfocite T. Nadalje, takve nezrele dendritičke stanice smanjuju proizvodnju proupalnih citokina poput TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  i



IL-12 istovremeno povećavajući proizvodnju protuupalnog IL-10 (36). Dakle, u prisustvu MMS dendritičke stanice u potpunosti mijenjaju svoj fenotip i poprimaju funkciju supresora imunološke reakcije (44). Smatra se da MMS svoj učinak na dendritičke stanice ostvaruju putem topivih čimbenika, prvenstveno IL-6, čimbenika rasta makrofagnih kolonija (*engl. macrophage colony stimulating factor*, M-CSF) te PGE2 (36, 45). Iz navedenog je moguće zaključiti da MMS ne snizuju proliferaciju limfocita T samo ranije opisanim izravnim mehanizmom, već i posredno, sprječavajući sazrijevanje dendritičkih stanica, a time i njihovo predočavanje antigena limfocitima T (46).

#### **1.4.3. Učinak MMS na limfocite B**

Ljudske MMS su sposobne inhibirati proliferaciju limfocita B, kao i njihovu diferencijaciju, sposobnost proizvodnje protutijela te svojstvo kemotaksije (47). Krampera i suradnici su pokazali da MMS navedene učinke iskazuju samo u prisustvu INF- $\gamma$ , no mehanizmi kojima to postižu još nisu sasvim razjašnjeni. Ipak, smatra da je ovakav učinak posljedica lučenja čimbenika poputIDO (48) te zaustavljanja stanica u G0/G1 fazi staničnog ciklusa što je učinak kojim MMS djeluju i na limfocite T (47).

#### **1.4.4. Učinak MMS na stanice NK**

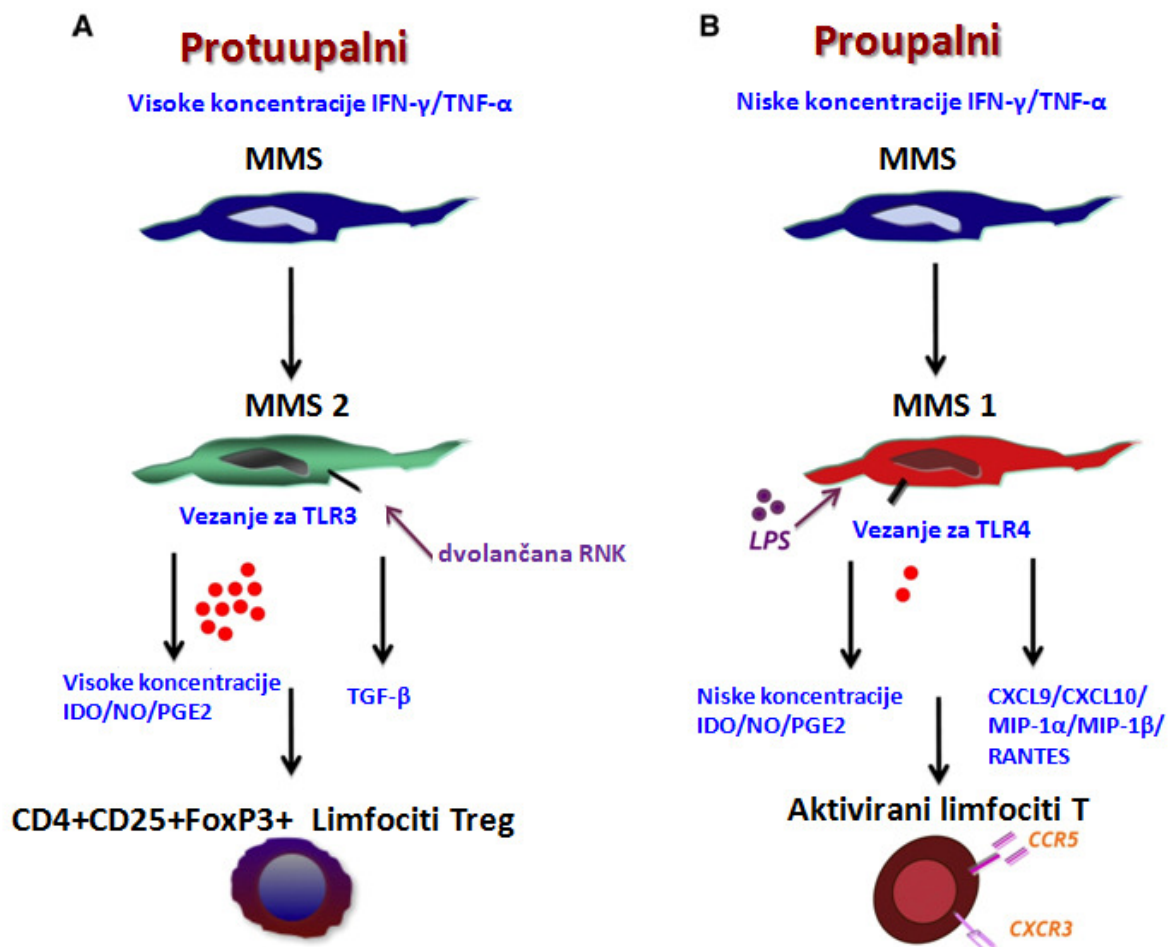
Stanice NK su glavni efektori urođene komponente imunološkog sustava, a njihova je glavna uloga uklanjanje malignih i virusom inficiranih stanica koje prepoznaju na temelju izostanka izražaja molekula HLA razreda I (46). Nekoliko je studija potvrdilo da proliferacija stanica NK potaknuta s IL-2 ili IL-15 može biti inhibirana u prisustvu MMS. Svoj supresivni učinak MMS postižu djelovanjem topivih čimbenika PGE-2 i TGF- $\beta$  čiji su mehanizmi djelovanja međusobno neovisni. No, supresija proliferacije stanica NK pomoću MMS još je jače izražena kada je prisutan i izravni međustanični kontakt. U tom slučaju MMS izazivaju smanjenje izražaja receptora 2B4 i NKG2D na površini stanica NK koji služe kao glavni receptori za prepoznavanje antigena na tumorskim i oštećenim stanicama, pa smanjenje njihova izražaja uzrokuje smanjenje citotoksičnosti stanica NK (49). Međutim, treba naglasiti da je supresivno djelovanje MMS prisutno samo tijekom njihove interakcije s neaktiviranim stanicama NK. Naime, stanice NK koje su aktivirane čak i malim dozama IL-2, pokazuju snažno citotoksično djelovanje te brzo liziraju autologne i alogene MMS povezujući svoje receptore s odgovarajućim ligandima na površini MMS (50). Ovakva opažanja do kojih se došlo eksperimentima *in vitro* ne moraju odražavati stanje u uvjetima *in vivo* u kojima interakcija među staničnim populacijama ponajviše ovisi o lokalnom mikrookolišu. Stoga u zdravom

organizmu stanice NK u pravilu ne uništavaju MMS, vjerojatno zbog toga što su populacije MMS malene i lokalizirane u tkivnim nišama, gdje nisu izravno dostupne stanicama NK, kao i zbog činjenice da u fiziološkim uvjetima MMS ne izražavaju odgovarajuće ligande za receptore na stanicama NK što onemogućuje međustanični kontakt (50). Čak i kada se u upalnom okruženju MMS nađu u neposrednoj blizini stanica NK, one ipak ostaju zaštićene od njihovog citotoksičnog djelovanja. Naime, stanice NK tijekom upalnog procesa luče  $\text{INF-}\gamma$ , koji pojačava izražaj molekula HLA razreda I na MMS zbog čega ih stanice NK ne liziraju (46). U kontekstu kliničke primjene MMS, treba uzeti u obzir da supresivno djelovanje MMS može imati povoljni učinak u stanjima poput transplantacije organa i tkiva te autoimunih bolesti, no takva bi imunosupresija mogla izazvati negativne posljedice u imunoterapiji tumora pomoću stanica NK (49).

#### **1.4.5. Uloga Toll-like receptora u polarizaciji MMS**

Posljednjih nekoliko godina intenzivno se istražuje uloga receptora nalik na Toll (*engl. Toll-like receptor*, TLR) u modulaciji imunološke reakcije pomoću MMS. U ljudi je poznato najmanje 10 TLR (34) izraženih većinom na stanicama imunološkog sustava, no izražaj TLR3 i TLR4 utvrđen je i na MMS izoliranim iz KS. TLR su posebna vrsta receptora zadužena za vezanje molekula koje u organizmu signaliziraju opasnost. Riječ je o tvarima kao što su endotoksin, bakterijski lipopolisaharid (LPS), virusna dvolančana RNK i proteini toplinskog šoka (*engl. heat shock proteins*) koje se otpuštaju iz tkiva zahvaćenog ozljedom ili infekcijom mikroorganizmima (51). Vezanjem navedenih liganada za TLR na stanicama imunološkog sustava dolazi do snažne aktivacije efektorskih stanica urođene imunosti, prvenstveno makrofaga i neutrofila. No navedeni se ligandi vežu i za TLR na površini MMS što snažno utječe na njihova svojstva (52). Naime, danas je prihvaćeno mišljenje da ovisno o signalima koje dobivaju iz svojeg okruženja, MMS mogu poprimiti protuupalni (MMS2) ili proupalni fenotip (MMS1) (53) (Slika 2). U upalnom okruženju, pod utjecajem proupalnih citokina  $\text{TNF-}\alpha$  i  $\text{INF-}\gamma$ , MMS poprimaju imunosupresivni fenotip (MMS2) te luče velike količine topivih čimbenika koji suprimiraju proliferaciju limfocita T i potiču diferencijaciju regulatornih limfocita T. Isti učinak nastaje u uvjetima virusne infekcije kada vezanje virusne dvolančane RNK za receptor TLR3 na MMS potiče njihovo protuupalno djelovanje. Suprotno tome, u okruženju s niskim koncentracijama  $\text{TNF-}\alpha$  i  $\text{INF-}\gamma$ , MMS mogu poprimiti proupalni fenotip (MMS1) i lučiti citokine kojima će privući limfocite T. Ista polarizacija MMS prema fenotipu MMS1 nastaje kada se za njihov receptor TLR4 veže LPS nastao tijekom infekcije organizma s Gram-negativnim bakterijama. MMS tada luče vrlo niske razine

imunosupresivnih čimbenika poputIDO i NO. Ravnoteža između ova dva, naizgled kontradiktorna, fenotipa MMS važna je zbog obrane organizma te sprječavaju pretjerano oštećenje tkiva, istovremeno potičući njegov popravak (52). Sposobnost polarizacije MMS prema različitim fenotipovima svoj bi značaj mogla naći i u kliničkoj primjeni. Naime, MMS bi se u uvjetima *in vitro* mogle stimulirati vrlo specifičnim ligandom za TLR, čime bi se usmjerile prema željenom fenotipu. Ovako aktivirane stanice modulirane i vrlo specifične funkcije potom bi se mogle transplantirati primatelju u kojem bi izazvale ciljani terapijski učinak (54).



Slika 2. Polarizacija MMS prema protuupalnom i proupalnom fenotipu

**A.** U upalnom okruženju (visoke koncentracije TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ ) MMS se aktiviraju i poprimaju imunosupresivni fenotip (MMS2) te luče visoke koncentracije topljivih čimbenika poputIDO, PGE2, NO, TGF- $\beta$ , HGF i HO koji suprimiraju proliferaciju limfocita T. Polarizacija MMS prema imunosupresivnom fenotipu može nastati i vežanjem liganda za receptore nalik Tollu (TLR) na površini MMS. Vežanje virusne dvolančane RNK za TLR3 izaziva nastanak protuupalnog fenotipa MMS2, što zajedno s konstantnim lučenjem TGF- $\beta$  pogoduje diferencijaciji regulatornih limfocita T.

**B.** U okruženju bez upale (niske koncentracije TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ ), MMS mogu poprimiti proupalni fenotip (MMS1) i pojačati djelovanje limfocita T lučenjem kemokina poput MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, CXCL9, CXCL10 koji limfocite T usmjeravaju na mjesto upale. Ovi kemokini se vežu za receptore na limfocitima T poput CCR5 i CXCR3. Polarizaciju prema proupalnom fenotipu (MMS1) izaziva i aktivacija receptora TLR4 pomoću niskih razina lipopolisaharida (LPS) iz Gram-negativnih bakterija. Nakon poprimanja proupalnog fenotipa, MMS luče niske razine imunosupresivnih čimbenikaIDO i NO. *Prilagođeno prema Bernardo i sur. Cell Stem Cell. 2013;13(4):392-402.*

### **1.5. Fiziološka uloga MMS u reguliranju hematopoeze i popravku oštećenog tkiva**

Otkriće prisustva MMS u gotovo svim tkivima i organima uzrokovalo je brojne dvojbe o njihovoj ontogenezi i fiziološkoj ulozi u organizmu. Najbolje je poznata uloga koju MMS imaju u KS, gdje stvaranjem stanica poput osteoblasta, hondrocita i adipocita te lučenjem topivih čimbenika i adhezijskih molekula izravno utječu na proces hematopoeze (55). Trentin je još 1971. godine postavio hipotezu da se diferencijacija krvotvornih matičnih stanica (KMS) u KS odraslog čovjeka događa nakon interakcije s nekrvotvornim stranicama u stromalnom okruženju (56). Danas je ova hipoteza općenito prihvaćena te se smatra da KMS u KS obitavaju unutar mikrookoliša zvanog „hematopoetska niša“ u kojem je ravnoteža između procesa samoobnavljanja i diferencijacije KMS pod utjecajem signala iz okolne strome (57). Iako je danas poznato da su MMS široko rasprostranjene u organizmu, njihova ontogeneza nije u potpunosti jasna. Pojedini znanstvenici smatraju da perivaskularni položaj MMS u tkivima ukazuje na njihov nastanak iz pericita i adventicijskih stanica koje oblažu sve krvne žile, a kojima MMS izrazito nalikuju (2, 58). Prema toj hipotezi MMS *in vivo* stvaraju perivaskularne niše koje su u fiziološkim uvjetima zadužene za održavanje tkivne i imunološke homeostaze, a u slučaju ozljede se aktiviraju i potiču popravak tkiva (59). Hipotezu lokalizacije MMS u nišama postavio je i Prockop u jednom od tri modela kojima objašnjava mehanizme kojima ove stanice sudjeluju u popravku tkiva (60). Naime, osim već spomenutog modela hematopoetske niše, Prockop postavlja i drugi prema kojem MMS posjeduju sposobnost migriranja u oštećeno tkivo gdje dolazi do njihovog prihvata i diferencijacije u stanice izgubljene lokalnom ozljedom. Uistinu, transgenični miševi koji su predstavljali model za bolest osteogenesis imperfecta pokazali su smanjenje fragilnosti kostiju nakon intravenozne primjene MMS što bi upućivalo na *in situ* diferencijaciju infundiranih MMS u osteoblaste (61). Također, kada su obilježene MMS ubrizgane u mozak miševa, neke od obilježenih stanica diferencirale su se u astrocite (62). Ipak, u nastojanjima da se objasne mehanizmi djelovanja MMS, većina je znanstvenika prihvatila Prockopov treći model prema

kojem se MMS samo privremeno prihvaćaju u oštećenom tkivu stvarajući prolazne niše u kojima parakrinim djelovanjem i međustaničnim kontaktom izazivaju terapijski učinak. Naime, brojni eksperimenti na životinjskim modelima su pokazali da se intravenozno primijenjene MMS prvo nakupljaju u plućima, no nakon jednog sata iz njih gotovo potpuno nestaju i migriraju u druge organe, te prema mjestu ozljede na koje su vjerojatno privučene kemotaksijom (63). Ključni kemokin u tom procesu je čimbenik stromalnih stanica 1 $\alpha$  (*engl. stromal derived factor 1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$* ) koji se pojačano luči na mjestu ozljede, a veže se za receptor CXCR4 na MMS (64). Pokazano je, međutim, da se neko vrijeme nakon izazivanja terapijskog učinka pomoću alogeničkih MMS, u tkivu mogu detektirati uglavnom stanice domaćina. Takva opažanja dokazuju da MMS djeluju bez trajnog prihvata na mjestu ozljede i objašnjavaju zašto su za postizanje trajnijeg terapijskog učinka obično potrebne ponavljajuće infuzije MMS (65).

### **1.6. Klinička primjena MMS umnoženih *in vitro***

Zbog sposobnosti da regeneriraju oštećeno tkivo i smanjuju upalu, MMS su izazvale veliki interes u području regenerativne medicine i tkivnog inženjerstva. Zahvaljujući imunomodulatornim svojstvima, imunoprivilegiranosti te parakrinom djelovanju, MMS su do danas korištene u kliničkim studijama za indikacije iz područja hematologije, onkologije, imunologije, neurologije, kardiologije i gastroenterologije (66). Primjena MMS umnoženih *in vitro* u kliničkim studijama započela je još sredinom 90-ih godina prošlog stoljeća kada je Lazarus dokazao da se MMS umnožene *in vitro* mogu primijeniti intravenozno bez izazivanja nuspojava (67). Prvo kliničko ispitivanje u kojem se ispitivao terapijski učinak MMS proveli su Koc i suradnici 2000. godine kada su pacijenticama s uznapredovalim stadijem karcinoma dojke tijekom autologne transplantacije KMS, transplantirali i autologne MMS umnožene *in vitro* s ciljem boljeg prihvata transplantata KMS i potpore hematopoezi (68). Prema podacima američkog Nacionalnog instituta za zdravlje (*engl. National Institut of Health, NIH*) u travnju 2015. godine je bilo registrirano više od 500 kliničkih ispitivanja temeljenih na primjeni MMS. Većinom (42%) se radilo o bolestima koje u podlozi imaju poremećaj imunološkog sustava ili upalno stanje, a među njima su najzastupljenije indikacije bile bolest presatka protiv primatelja, osteoartritis, upalne bolesti dišnih puteva, multipla skleroza, odbacivanje solidnih organa, dijabetes, upalne bolesti crijeva i sistemski lupus eritematosus (69-72). Velik je udio (23%) i studija u kojima se MMS koriste u liječenju bolesti kosti i hrskavice (73), a postoje i primjeri njihove primjene u liječenju pojedinih bolesti jetre, bubrega i pluća (74).

Također, zbog sposobnosti poticanja angiogeneze, MMS su korištene i u liječenju kroničnih rana (75) i opekline (76).

### **1.6.1. Prihvat presatka KMS i potpora hematopoezi**

Najteža rana komplikacija nakon transplantacije alogernih KMS je primarno odbacivanje presatka koje je uzrokovano imunološkom reakcijom usmjerenom protiv alogernih krvotvornih progenitora ili nedovoljnim brojem progenitora u presatku. U slučaju HLA-podudarne transplantacije KMS kod bolesnika s mijeloablativnom pripremom visokog intenziteta, učestalost primarnog odbacivanja presatka je <5%, no značajno raste u slučajevima pripreme smanjenog intenziteta i HLA-haploidentične transplantacije ili prethodne HLA-aloimunizacije primatelja (65). Rezultati istraživanja na miševima su pokazali da se prihvat presatka KMS može poboljšati kotransplantacijom s MMS (77), što je bio temelj za istraživanje učinka MMS u pružanju potpore hematopoezi kod ljudi. Sigurnost intravenozne primjene autolognih MMS je 1995. godine dokazao Lazarus (67), dok je Koc u studiji s pacijenticama s karcinomom dojke uočio ubrzani hematološki oporavak nakon kotransplantacije KMS i MMS (68). Lazarus i Koc su 2005. godine predvodili veliku multicentričnu studiju u kojoj su kod hematoloških bolesnika prvi puta dokazali sigurnost primjene alogernih HLA-nepodudarnih MMS (78). Na temelju tih spoznaja, Le Blanc i suradnici su 2007. godine proveli kotransplantaciju KMS s MMS kod sedam pacijenata, od kojih se kod troje željelo prevenirati ranije zabilježeno odbacivanje presatka KMS, dok je kod četvero pacijenata cilj bio omogućiti uspješan prihvat alogernih KMS. Rezultati su bili vrlo obećavajući. Kod pacijenata je došlo do brzog oporavka hematopoeze (unutar 12 dana) i 100%-tnog prihvata presatka KMS, uključujući i pacijente koji su prije ove terapije već jednom odbacili presadak alogernih KMS (79). Izvrsne rezultate imala je i studija nizozemske skupine predvođene Ballom u kojoj je povijesna stopa odbacivanja presatka KMS od 15% uspoređena sa stopom odbacivanja presatka nakon kotransplantacije KMS i MMS kod 14 pedijatrijskih pacijenata. Kod svih pacijenata kojima su infundirane MMS došlo je do hematološkog oporavka bez povećane stope infekcija u odnosu na kontrolnu povijesnu skupinu. Smanjenu stopu odbacivanja presatka KMS pripisali su imunosupresivnom učinku MMS na aloreaktivne limfocite T domaćina koji nisu eradikirani pripremom za transplantaciju (80). Kasnije neovisne studije MacMillana, Fanga i Kuci su dodatno potvrdile da infuzija autolognih ili alogernih MMS može ubrzati hematološki oporavak i smanjiti rizik od odbacivanja alogernog presatka i učestalost komplikacija (81, 82).

### 1.6.2. Bolest presatka protiv primatelja

Bolest presatka protiv primatelja (*engl. graft versus host disease, GvHD*) je jedna od najčešćih komplikacija nakon transplantacije alogenih KMS, a određuju je dva klinička oblika: akutni GvHD (aGvHD) koji nastaje unutar prvih 100 dana od transplantacije te kronični GvHD (cGvHD) koji se javlja u kasnom poslijetransplantacijom razdoblju (83). U složenom mehanizmu nastanka GvHD-a glavnu ulogu imaju aloreaktivni limfociti T darivatelja koji nakon aktivacije antigenima primatelja snažno proliferiraju, izazivaju „citokinsku oluju“ i stvaraju teška oštećenja u brojnim tkivima, posebice koži, jetri i probavnom sustavu (84). Zlatni standard u inicijalnom liječenju aGvHD-a predstavljaju steroidi, zbog čega bolesnici koji su refraktorni na ovaj tip terapije imaju osobito lošu prognozu bolesti (65, 85). Primjena MMS u liječenju aGvHD-a započela je objavom slučaja Le Blanc i suradnika koji su MMS primjenili kod devetogodišnjeg pacijenta s teškim oblikom aGvHD-om koji je zahvatio jetru i crijeva bolesnika te se pokazao refraktornim na visoke doze steroida (86). Tjedan dana nakon infuzije  $2 \times 10^6$  haploidentičnih MMS/kg tjelesne težine (TT) dobivenih iz KS djetetove majke, došlo je do dramatičnog poboljšanja stanja bolesnika. Iako je dječak naknadno morao primiti još jednu dozu MMS s manjim brojem stanica ( $1 \times 10^6$  MMS/kg TT), izlječenje od aGvHD-a je bilo uspješno i dugotrajno. Na temelju ovih izvrsnih rezultata pokrenuto je više multicentričnih kliničkih istraživanja u kojima su za liječenje aGvHD-a korištene autologne, haploidentične ili HLA-nepodudarne MMS kojima je pokazana njihova učinkovitost u terapiji teškog oblika aGvHD-a refraktornog na steroide (87, 88). Ipak, treba istaknuti da su navedeni učinci MMS u olakšavanju simptoma aGvHD-a u pojedinim studijama izostali. Takva opažanja mogu se pripisati heterogenosti u dizajnu različitih studija u smislu razlika u populaciji pacijenata (pedijatrijski nasuprot odraslih) i izvora KMS kojima su bolesnici transplantirani (KS, periferna krv, krv iz pupkovine). Također, razlike se odnose i na MMS umnožene u kulturi *in vitro* u smislu uzgojnih uvjeta, broja ciklusa presađivanja i eventualne krioprezervacije stanica, što je moglo utjecati na konzistentnost rezultata (69). Međutim, MMS i dalje ostaju vrlo obećavajuća vrsta terapije za liječenje aGvHD-a i s njim povezanih komplikacija, što potvrđuje i činjenica da je u 2016. godini u NIH bazi bilo registrirano 46 kliničkih istraživanja u kojima se analizirao učinak MMS na ovu tešku bolest (69). Važna prednost imunomodulacije s MMS u odnosu na terapiju imunosupresivnim lijekovima je sposobnost MMS da ublažavaju patogenezu aGvHD-a, ne narušavajući pritom učinak presatka protiv leukemije (*engl. graft versus leukemia, GvL*), odnosno djelovanje imunokompetentnih stanica presatka na zloćudne tumorske stanice

domaćina. MMS uspijevaju očuvati GvL učinak migracijom u sekundarne limfoidne organe gdje inhibiraju proliferaciju aloreaktivnih limfocita T prvenstveno lučenjem čimbenika PGE2 (89).

### **1.6.3. Koštane bolesti**

Prva primjena MMS u liječenju koštanih oboljenja zabilježena je 1999. godine kod tri pedijatrijska pacijenta koji su bolovali od osteogenesis imperfecta (OI), genetske bolesti uzrokovane proizvodnjom defektnog oblika kolagena tipa I, čije su glavne značajke usporen rast i progresivna deformacija kostiju, kao i sklonost prijelomima (90). Horwitz i suradnici su u navedenom istraživanju bolesnicima s najtežim oblikom OI infundirali nemanipulirane stanice KS i uočili poboljšanja u histologiji i ukupnom sadržaju minerala u kostima bolesnika, kao i ubrzani koštani rast (91). Budući da je stupanj koštanog rasta s vremenom opadao, Horwitz je u sljedećoj studiji primijenio obilježene MMS i dokazao da barem mali dio stanica završi u kostima domaćina. U toj studiji su bolesnici liječeni s MMS postigli 70% koštanog rasta očekivanog za zdravu djecu podudarne dobi i spola. Stoga je pretpostavljeno da se MMS nakon prihvata u kostima diferenciraju u osteoblaste i na taj način izazivaju kratkoročne povoljne učinke (92). Slični mehanizam djelovanja MMS je predložio i Whyte sa suradnicima kada je teško bolesnom djetetu s hipofosfatazijom, rijetkim poremećajem mineralizacije kostiju, infundirao MMS i postigao generaliziranu remineralizaciju kostiju bez novih prijeloma (93). Kada je nakon gotovo 2 godine kod djeteta došlo do ponovne pojave simptoma, infuzijom nove doze MMS postignut je jednako dobar i dugotrajan klinički odgovor. Šest godina nakon terapije s MMS oboljela djevojčica je ostala manjeg rasta, no pokretna i bez bolova u kostima i zglobovima. Unatoč iznimnim rezultatima u liječenju rijetkih genetskih poremećaja poput OI i hipofosfatazije, MMS se danas najviše primjenjuju u liječenju upalnih bolesti zglobova, osobito osteoartritis (OA), u kojem postupno trošenje hrskavice uzrokuje ukočenost zglobova i lokalnu upalu. U 2015. godini bilo je registrirano 38 kliničkih studija u kojima se istraživalo djelovanje MMS u ublažavanju simptoma ove bolesti (69). Preliminarni rezultati ukazuju na smanjenje boli i regeneraciju hrskavice kod bolesnika što se može pripisati sposobnosti MMS da kratkoročno suprimiraju lokalnu upalu i potaknu diferencijaciju hondrocita (94).

### **1.6.4. Multipla skleroza**

Multipla skleroza (MS) je upalni demijelinizirajući poremećaj središnjeg živčanog sustava (SŽS) koji je posredovan polarizacijom CD4<sup>+</sup> limfocita T u stanice s Th1 i Th17 fenotipom



čije autoimuno djelovanje izaziva kumulativno i nepovratno oštećenje SŽS. Pretklinička istraživanja su pokazala da topivi čimbenici koje luče MMS mogu učinkovito suprimirati upalu u neurološkom okruženju, smanjiti lokalne lezije i smanjiti simptome neuroloških funkcionalnih deficita (95). Primjena MMS kod miševa koji predstavljaju model za MS dovela je do smanjenja upale i ublažavanja tijeka bolesti budući da su MMS suprimirale proliferaciju i infiltraciju autoreaktivnih Th1/Th17 stanica djelujući preko čimbenikaIDO, istovremeno potičući diferencijaciju Th2 stanica i regulatornih limfocita T (69). Obećavajući rezultati na animalnom modelu, kao i samo djelomična učinkovitost lijekova za MS, osobito u progresivnim fazama bolesti, potaknuli su interes za nove oblike liječenja MS, te su trenutno registrirane 23 studije u kojima se ispituje učinak MMS na MS. U navedenim studijama, MMS se oboljelima infundiraju intravaskularno ili intratekalno u dozi od  $2 \times 10^6$  MMS/kg TT (96), a iako preliminarni nalazi ne pokazuju revolucionarne rezultate, primjećeno je blago smanjenje u broju aktivnih lezija što govori u prilog protuupalnom djelovanju MMS (97).

#### **1.6.5. Kardiovaskularne bolesti**

Ishemijske bolesti srca i kongestivni srčani zastoj su među vodećim uzrocima smrti u svjetskoj populaciji zbog čega se kontinuirano istražuju novi terapijski pristupi u liječenju ovih bolesti. U NIH bazi registrirana su 43 klinička ispitivanja u kojima se prati učinak MMS u različitim kardiovaskularnim bolestima, što čini 14,8% svih studija s MMS (98). Jedna od najčešćih indikacija za ovakav oblik liječenja je infarkt miokarda kod kojeg uslijed oštećenja kardiomiocita dolazi do poremećaja u kontraktilnosti srca, a odumrle stanice srčanog mišića zamjenjuju fibroblasti stvarajući tkivni ožiljak (95). Hare i suradnici su 2009. godine objavili rezultate randomizirane kliničke studije u kojoj su MMS primijenjene kod bolesnika s preboljelim infarktom miokarda (99). Bolesnicima je infundiran komercijalni pripravak HLA-nepodudarnih MMS (Prochymal) u jednoj dozi od  $0,5-5 \times 10^6$  MMS/kg TT. Šestomjesečnim praćenjem je kod skupine tretirane s MMS utvrđen manji broj epizoda ventrikularne tahikardije i povećana ejekcijska frakcija lijevog ventrikla u odnosu na kontrolnu skupinu bolesnika. Točan mehanizam kojim su MMS izazvale kliničke učinke nije istražen, no terapijski se učinak na temelju prijašnjih spoznaja pripisao sposobnosti MMS da potiču angiogenezu, inhibiraju širenje nastalog ožiljka, te potiču diferencijaciju kardiomiocita.

#### **1.6.6. Ozljede mozga i leđne moždine**

MMS su primijenjene i u kliničkim studijama kod bolesnika s ozljedama mozga i leđne moždine. Lee i suradnici su proveli randomiziranu kliničku studiju u kojoj su ispitali učinak

infuzija MMS na oporavak bolesnika nakon ishemijskog moždanog udara. Bolesnicima su infundirane dvije doze od ukupno  $1 \times 10^8$  autolognih MMS, u petom i sedmom tjednu nakon moždanog udara. Nedugo nakon primjene MMS primjećen je blagi, ali prolazni klinički oporavak koji je korelirao s povećanom razinom čimbenika stromalnih stanica  $1\alpha$  (*engl. stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$* ) u serumu bolesnika. Budući da je poznato da se SDF-1 $\alpha$  nakon infarkta miokarda i ishemijskog moždanog udara povlači iz cirkulacije u stijenku oštećene krvne žile, pretpostavljeno je da je njegova lokalno povećana razina uzrokovala migraciju MMS u oštećeno područje gdje su izazvale terapijski učinak (100). Pal i suradnici su 2009. ispitali sigurnost i učinkovitost intratekalne primjene autolognih MMS kod bolesnika s ozljedama leđne moždine. Bolesnici su primili više doza od  $1 \times 10^6$  MMS/kg TT direktnom injekcijom u lumbalni prostor. Kod bolesnika čija je ozljeda nastala u torakalnom dijelu kralježnice i to u razdoblju kraćem od 6 mjeseci prije terapije s MMS, došlo je do značajnog napretka u kvaliteti života u smislu povrata osjeta u području mokraćnog mjehura i crijeva. Iako je zamijećen i umjeren neurološki oporavak u senzoričkim i motoričkim parametrima koji se mogao pripisati remijelinizaciji, on ipak nije bio dovoljan da bude mjerljiv radiološkim i elektrofiziološkim metodama (101).

### **1.6.7. Opekline uzrokovane radioaktivnim zračenjem**

Opekline uzrokovane radioaktivnim zračenjem najčešće nastaju kao posljedica slučajnog izlaganja izvoru ionizirajućeg zračenja. Mehanizam nastanka i klinička prezentacija radijacijskih opeklin, kao i terapijski pristupi za njihovo liječenje, bitno su različiti u odnosu na opekline nastale djelovanjem toplinske ili električne energije. Radijacijske opekline prezentiraju se u obliku početnog osipa i svrbeža na ozračenom dijelu tijela, nakon čega dolazi do pojave ulkusa i nekroze u zahvaćenom tkivu. Upalni procesi se zatim progresivno šire u dublje kožne strukture, te zahvaćaju mišiće, krvne žile i kosti, a popraćeni su izrazito teškim bolovima (102). Konvencionalni terapijski pristup, koji podrazumijeva eksciziju nekrotičnog tkiva i primjenu autolognog kožnog presatka, izuzetno je otežan nepredvidljivim i nekontroliranim širenjem radijacijske lezije. Budući da je ovaj patofiziološki proces posredovan kontinuiranom aktivacijom stanica imunološkog sustava, pretpostavljeno je da bi lokalno primijenjene MMS mogle suprimirati imunološku reakciju i potaknuti proces cijeljenja. Lataillade i suradnici su opisali dva klinička slučaja u kojima su pacijentima s teškim radijacijskim opeklinama oštećeno tkivo nadomjestili autognim kožnim presatkom i potom lokalno primijenili MMS izolirane iz KS bolesnika (103). Primjena autolognih MMS zaustavila je daljnje širenje upalnog procesa, umanjila bol i potaknula regeneraciju tkiva, što

je pripisano djelovanju topivih čimbenika poput TGF- $\beta$ . Nakon godinu dana, rana je kod oba bolesnika u potpunosti zacijelila što govori u prilog tome da je primjena MMS obećavajući oblik liječenja teških oštećenja kože i mišića uzrokovanih radioaktivnim zračenjem.

#### **1.6.8. Klinička primjena genetički izmijenjenih MMS**

Posljednjih godina započete su i kliničke studije u kojima se ispituje učinak genetički izmijenjenih MMS, kojima je ugrađen plazmid s ciljnim transgenom čiji bi izražaj trebao izazvati lokalni terapijski učinak (104). Dvije su takve studije trenutno u tijeku, a vezane su za teške bolesti, poput kritične ishemije ekstremiteta koja najčešće završava amputacijom i neizlječive Huntingtonove bolesti. U prvoj se studiji bolesnicima s kritičnom ishemijom ekstremiteta infundiraju MMS koje proizvode povećanu količinu čimbenika rasta krvožilnog endotela (*engl. vascular endothelial growth factor, VEGF*). Na temelju prethodnih istraživanja na animalnim modelima očekuje se da MMS kemotaksijom budu privučene u hipoksično okruženje okludirane arterije, gdje bi lučile povećane količine VEGF i lokalno poticale angiogenezu. U drugoj studiji se kod bolesnika s Huntingtonovom bolesti primjenjuju MMS koje proizvode neurotrofički čimbenik podrijetlom iz mozga (*engl. brain – derived neurotrophic factor, BDNF*), čije su razine kod ovih bolesnika snižene. Istraživanja na transgeničnim miševima su pokazala da BDNF sprječava propadanje neurona te stimulira rast i migraciju novih neurona u mozgu, zbog čega bi kod bolesnika s Huntingtonovom bolesti mogao imati zaštitnu ulogu i tako usporiti napredovanje bolesti.

#### **1.7. Uzgoj MMS u kulturi *in vitro***

U ljudskim tkivima MMS su prisutne u jako malom broju, te primjerice u KS čine svega 0,01% svih stanica s jezgrom (105). Iz navedenog razloga konvencionalnim metodama nije moguće prikupiti MMS u dovoljnom broju za izazivanje terapijskog učinka kod primatelja, te je u slučaju kliničke primjene neophodno njihovo prethodno umnažanje u kulturi *in vitro*. Međutim, poznato je da uvjeti kojima su stanice izložene tijekom uzgoja *in vitro* mogu utjecati na njihove biološke značajke poput morfologije, brzine proliferacije, diferencijacijskog potencijala i sl. Primjerice, pokazano je da smanjenje koncentracije kisika na približno 1% tijekom uzgoja MMS *in vitro* pojačava njihovo imunomodulatorno djelovanje. U takvim okolnostima MMS luče povećane količine čimbenika VEGF i bazičnog fibroblastnog čimbenika rasta (bFGF) te laktata koji uzrokuje polarizaciju makrofaga prema protuupalnom fenotipu (106). Hipoksični uvjeti tijekom uzgoja MMS *in vitro* potiču povišeni izražaj gena matičnosti Rex-1 i Oct-4 koji doprinose samoobnavljanju MMS bez poticanja

diferencijacije. U uvjetima *in vivo* to je osobito važno na mjestima tkivne ozljede, gdje lokalno smanjena koncentracija kisika održava MMS u nediferenciranom stanju osiguravajući na taj način dovoljnu količinu topivih čimbenika za popravak ozljeđenog tkiva (107). Rosova i suradnici su ispitali utjecaj uzgojnih uvjeta na migracijski potencijal MMS koristeći *in vitro* model umjetne rane. Na dnu kultivacijske posude s konfluentnim slojem MMS, stvorili su „ogrebotinu“ simulirajući ozljeđeno tkivo. Primjetili su da su MMS uzgajane u hipopoksičnim uvjetima migrirale na mjesto ozljede i regenerirale oštećeni sloj, dok MMS koje su umnažane pri atmosferskoj koncentraciji kisika nisu imale tu sposobnost. Isti stupanj migracije MMS postignut je i tijekom uzgoja u prisustvu čimbenika HGF i to neovisno o koncentraciji kisika što dokazuje da se migracijski potencijal MMS *in vitro* može povećati u najmanje dva neovisna uzgojna uvjeta (108). Značajke stanica tijekom uzgoja *in vitro* mogu ovisiti i o vrsti uzgojne posude. Naime, dokazano je da uzgoj MMS na trodimenzionalnim nosačima rezultira stvaranjem povećane količine topivih čimbenika u odnosu na uzgoj u konvencionalnim uzgojnim posudama (107). Ipak, jedan od glavnih čimbenika koji utječe na značajke stanica u kulturi *in vitro* jest sastav uzgojnog medija (109). Spees je pokazao da sastav uzgojnog medija utječe na morfologiju stanica i njihov izražaj gena (110), dok su Muller i suradnici utvrdili da su proliferacijski kapacitet i vrijeme ulaska u senescenciju također određeni vrstom uzgojnog medija (111). Za uspješan rast stanica u kulturi *in vitro* uzgojni medij mora biti obogaćen izvorom vitalnih nutrijenata i čimbenika rasta. Iako se u tu svrhu već niz godina koriste sastojci životinjskog podrijetla, oni se zbog novih znanstvenih, sigurnosnih i etičkih spoznaja sve više nastoje zamijeniti alternativnim dodacima.

### **1.7.1. Fetalni goveđi serum**

Mediji za uzgoj različitih vrsta životinjskih i ljudskih stanica tradicionalno se obogaćuju fetalnim goveđim serumom (*engl. fetal bovine serum, FBS*). FBS ima vrlo složen sastav koji nije u potpunosti definiran, no poznato je da sadrži čimbenike rasta, proteine velike i male molekularne težine, lipide, vitamine, elemente u tragovima, hormone i druge sastojke kojima potiče stanični rast (112). Prvu kliničku studiju s MMS umnoženima *in vitro* u prisustvu FBS-a proveo je Lazarus 1995. godine, a sve do danas FBS je ostao zlatni standard za poticanje proliferacije različitih vrsta stanica *in vitro* (67). Meta-analiza kliničkih ispitivanja koju su 2012. godine proveli Lalu i suradnici potvrdila je da su MMS korištene u velikoj većini studija kod ljudi umažane u uzgojnom mediju s dodatkom FBS-a (66). Međutim, dugogodišnje iskustvo primjene FBS-a ukazalo je i na negativne učinke njegova prisustva u staničnim pripravcima namijenjenima za primjenu kod ljudi. Horwitz je 2002. godine u

serumu pojedinih pedijatrijskih pacijenata, koji su primili MMS kao terapiju za osteogenesis imperfecta, utvrdio postojanje protutijela usmjerenih protiv proteina iz FBS-a korištenog tijekom umnažanja stanica *in vitro* (92), a iste je nalaze prijavio i Sundin kod hematoloških bolesnika liječenih s MMS (113). Aloimunizacija na životinjske antigene nije neobična, ako se uzme u obzir da pripravak od  $1 \times 10^8$  MMS, što je prosječna doza koja se primjenjuje u kliničkim studijama, sadrži 7 do 30 mg proteina podrijetlom iz FBS-a. Spees je uzgojem MMS u prisustvu obilježenih proteina FBS-a dokazao da se navedeni proteini vežu za staničnu površinu, ali dijelom i preuzimaju u citoplazmu MMS. Zbog tog razloga se prijenos životinjskih antigenih u primatelja ne može izbjeći čak ni ukoliko se stanični pripravak prije primjene višestruko ispiri (110). Osim imunizacije, primjena FBS-a nosi i rizik prijenosa priona, virusa, i mikoplazmi, a u novije su se vrijeme javile i etičke dvojbe zbog žrtvovanja više od milijun fetusa goveda godišnje zbog proizvodnje FBS-a (114). Ujedno, velike sezonske i kontinentalne varijacije u sastavu goveđeg seruma odražavaju se i na sastav komercijalno dostupnih proizvoda, zbog čega su rezultati istraživanja provedenih s FBS-om različitih proizvođača i serija proizvodnje teško usporedivi (112). Sve navedeno doprinosi sve većem nastojanju da se umnažanje ljudskih stanica za kliničku primjenu provodi bez dodataka proizvoda životinjskog podrijetla. U tom smislu su u novije vrijeme predložene alternative FBS-u od kojih najznačajnije uključuju različite komponente ljudske krvi poput seruma ili plazme, seruma iz krvi iz pupkovine te različite derivate trombocita (111, 115).

### **1.7.2. Ljudski serum**

Dok je više istraživanja ukazalo na uglavnom povoljan učinak autolognog ljudskog seruma (*engl. autologous human serum*, autoHS) na proliferaciju MMS *in vitro* (110), rezultati utjecaja alogenog ljudskog seruma (*engl. allogeneic human serum*, aloHS) su kontradiktorni. Naime, Shahdadfar i Spees su u neovisnim istraživanjima utvrdili da uzgoj MMS iz KS u prisustvu aloHS dovodi do zastoja u staničnom rastu te smrti stanica (110, 116). Nasuprot tome, Kocaoemer i suradnici su uočili da MMS iz masnog tkiva u prisustvu aloHS proliferiraju značajno brže nego u prisustvu FBS-a (117), a pritom zadržavaju podjednaki diferencijacijski i klonogeni potencijal te imunosupresivna svojstva (118). S druge strane, MMS iz KS imale su podjednaku stopu rasta tijekom uzgoja u prisustvu aloHS i FBS-a (115). Dakle, iako i autogni i alogeni HS mogu potaknuti proliferaciju MMS *in vitro*, u slučaju umnažanja stanica za kliničku primjenu prednost se daje aloHS koji se priprema kao mješavina (*engl. pool*) seruma više zdravih darivatelja krvne grupe AB. Primjena autoHS u ovom kontekstu nije preporučljiva, budući da je volumen seruma koji se može dobiti od jedne

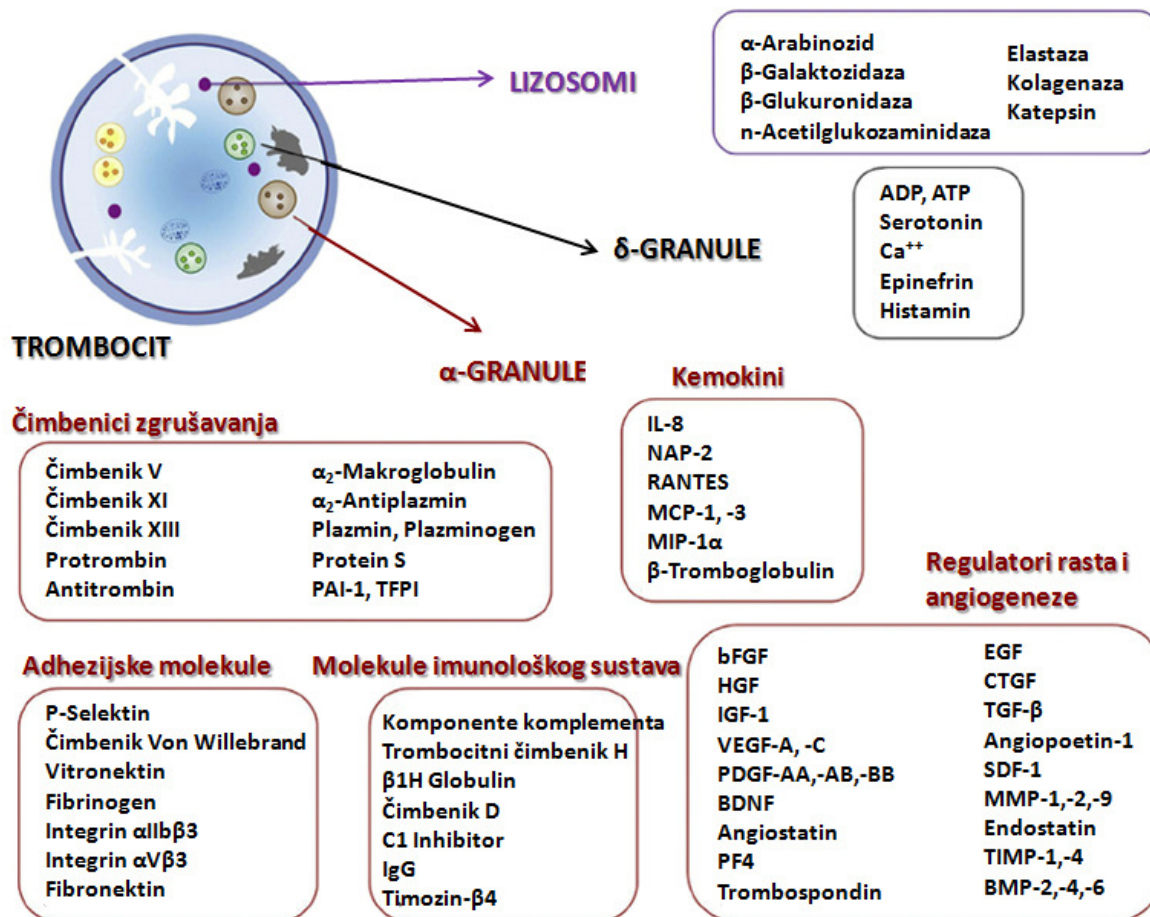
osobe ograničen, a moguća je i promjena sastava seruma zbog prethodne kemoterapije pacijenta (119).

### **1.7.3. Trombinom aktivirana plazma bogata trombocitima**

Više je istraživanja pokazalo da trombinom aktivirana plazma bogata trombocitima (*engl. thrombin-activated platelet rich plasma*, tPRP) učinkovito potiče proliferaciju MMS iz KS i masnog tkiva *in vitro* (115, 119). Djelovanje tPRP-a se temelji na sposobnosti trombina da aktivira trombocite, nakon čega oni, slično kao i u fiziološkim uvjetima, otpuštaju biološki aktivne čimbenike. Potencijalne negativne strane primjene tPRP-a uključuju relativno složen proces proizvodnje koji uključuje značajnu manipulaciju i primjenu dodatnih sastojaka poput ljudskog trombina i heparina. Osim toga, primjećeno je da MMS u prisustvu tPRP-a na plastičnoj podlozi stvaraju strukture slične mrežici što otežava stvaranje konfluentnog staničnog sloja. Ujedno, njihova sposobnost adheriranja je smanjena i sklone su odvajanju od plastične podloge, što bi u uvjetima *in vivo* moglo smanjiti mogućnost njihovog prihvata u tkivima (115, 117).

### **1.7.4. Lizat trombocita**

Trombociti imaju ključnu ulogu ne samo u primarnoj hemostazi već i u procesima cijeljenja rana i regeneracije tkiva u kojima sudjeluju pomoću brojnih aktivnih tvari sadržanih u organelima (120). Trombocitne  $\alpha$ -granule sadrže čimbenike zgrušavanja, citokine, adhezijske molekule te čimbenike rasta i angiogeneze, od kojih su najznačajniji prikazani na Slici 3.



Slika 3. Sadržaj trombocitnih organela. Trombocitni lizosomi i različite vrste granula pohranjuju različite aktivne sastojke poput enzima, čimbenika zgrušavanja, molekula imunološkog sustava, adhezijske molekule, kemokine i čimbenike rasta koji imaju važnu ulogu u hemostazi, obrani organizma, angiogenezi i popravku tkiva. *Prilagođeno prema Burnouf i sur. Biomaterials 76. 2016;371-387.*

Tijekom 80-ih godina prošlog stoljeća započelo se s primjenom derivata trombocita za poticanje proliferacije tumorskih staničnih linija *in vitro* (121), a 2005. godine Doucet je prva primijenila ljudski lizat trombocita (LT) za umnažanje MMS *in vitro* (122). Za proizvodnju LT koriste se koncentri trombocita dobiveni iz krvi jednom od tri standardne metode: iz trombocitno leukocitnog međusloja (*engl. buffy coat*, BC), plazme bogate trombocitima (*engl. platelet rich plasma*, PRP) ili produkta trombocitaferenze. Postoji nekoliko metoda proizvodnje LT iz koncentrata trombocita. Metoda zamrzavanja i otapanja koncentrata trombocita je zbog svoje jednostavnosti i ekonomičnosti najčešće korištena, a temelji se na svojstvu trombocita da pri odmrzavanju s niskih temperatura pucaju i oslobađaju aktivne tvari koje se nakon centrifugiranja mogu prikupiti u supernatantu. Metoda direktne aktivacije trombocita uključuje dodatak  $CaCl_2$  koji potiče endogeno stvaranje trombina, formiranje fibrina i

degranulaciju trombocita. Nadalje, oslobađanje sadržaja trombocitnih granula može se potaknuti i sonikacijom na frekvenciji od 20kHz ili djelovanjem otapala i detergenta kojim se ne postiže samo liziranje trombocita već i inaktivacija virusa s lipidnom ovojnicom (120). Dakle, iako je LT danas česti dodatak medija za uzgoj stanica *in vitro*, postoje velike varijabilnosti u načinu njegove pripreme. Navedene razlike se ne odnose samo na odabir metode liziranja trombocita, već i detalje poput primjerice temperature zamrzavanja koncentrata trombocita te broja ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. Ujedno, postoje i naznake da metoda aktivacije trombocita može utjecati na sadržaj kojeg trombociti oslobađaju iz svojih  $\alpha$ -granula (115). Varijabilnosti postoje i u krvnim grupama koncentrata trombocita korištenih za proizvodnju LT, pri čemu su najčešće korištene krvne grupe 0 i AB. Budući da nije u potpunosti razjašnjeno da li antigeni ABO sustava krvnih grupa i izohemaglutinini prisutni u LT imaju utjecaj na MMS tijekom uzgoja *in vitro*, odabiru krvne grupe trebalo bi se dati više pozornosti. Konačno, u nekim se centrima za proizvodnju LT koriste samo koncentрати trombocita kojima je istekao rok valjanosti od 5 dana, čime se izbjegavaju etičke dvojbe vezane uz trošenje zaliha krvnih pripravaka namijenjenih za liječenje bolesnika (123). Iz svega navedenog proizlazi da je usporedba rezultata istraživanja MMS umnoženih *in vitro* u prisustvu LT moguća samo ukoliko se standardiziraju svi aspekti proizvodnje LT, što je osobito značajno u slučaju kliničke primjene tako umnoženih MMS kod ljudi.



## **2. HIPOTEZA**

Uzgoj mezenhimskih matičnih stanica u mediju s dodatkom 10% lizata trombocita umjesto fetalnog goveđeg seruma omogućuje brže umnažanje stanica uz istovremeno očuvanje svih funkcijskih značajki ključnih za njihov klinički učinak prilikom kotransplantacije s krvotvornim matičnim stanicama.

### 3. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Protokoli različitih istraživačkih i kliničkih skupina razlikuju se u pogledu tkivnih izvora MMS i metoda njihove izolacije, te uzgojnih uvjeta *in vitro*. Budući da sastav medija u kulturi *in vitro* može bitno utjecati na značajke umnoženih stanica, opći cilj ovog istraživanja je istražiti biološke značajke MMS umnoženih *in vitro* u mediju s 10% LT i 5% LT te ih usporediti sa stanicama umnoženim u prisustvu FBS-a.

Svrha istraživanja je doprinijeti standardizaciji metoda i uvjeta uzgoja MMS *in vitro* te stvoriti temelje za razvoj kliničkog protokola umnažanja MMS u prisustvu LT namijenjenih za kotransplantaciju s krvotvornim matičnim stanicama.

Specifični ciljevi ovog rada bit će:

1. Istražiti kinetiku rasta MMS umnoženih *in vitro* u mediju s LT.
2. Istražiti klonogeni potencijal MMS umnoženih *in vitro* u mediju s LT.
3. Utvrditi sposobnost MMS uzgojenih u prisustvu LT da se diferenciraju u adipocite i osteoblaste.
4. Utvrditi da li MMS uzgojene u prisustvu LT iskazuju specifični imunofenotip svojstven MMS (CD45-, CD34-, CD14-, HLA-DR-, CD19-, CD90+, CD73+, CD105+).
5. Analizirati kariotip MMS uzgojenih u prisustvu LT kako bi se istražila mogućnost njihove transformacije u kulturi *in vitro*.
6. Utvrditi da li MMS umnožene *in vitro* u prisustvu LT inhibiraju proliferaciju limfocita potaknutu mitogenom.

## **4. MATERIJALI I METODE**

Uzorci korišteni u ovom istraživanju prikupljeni su u Zavodu za hematologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb (KBC Zagreb), dok je eksperimentalni dio rada izveden u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, te Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb. Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom te je odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC-a Zagreb i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### **4.1. Ispitanici**

U istraživanju je sudjelovalo 15 zdravih osoba koje su darovale koštanu srž (KS) za potrebe alogene transplantacije srodnom primatelju. Volumen KS koji se prikuplja za alogenu transplantaciju ovisi o tjelesnoj težini primatelja i uobičajeno iznosi 700-1300 ml (~15 ml/kg TT). Za potrebe ovog istraživanja ispitanicima su izvađena dodatna 3 ml KS. Uzorci su prikupljeni iz ilijačne kriste (lat. *crista iliaca posterior superior*) prema standardnom protokolu Zavoda za hematologiju KBC-a Zagreb. Ispitanici su prethodno upoznati s ciljem istraživanja i potpisali su obaviješteni pristanak za sudjelovanje u ispitivanju.

### **4.2. Materijali**

#### **4.2.1. Koncentrati trombocita**

Trombocitni pripravci korišteni u ovom istraživanju proizvedeni su iz krvi više dobrovoljnih darivatelja (*engl. pool*) u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu (HZTM) u Zagrebu uz odobrenje Etičkog povjerenstva HZTM-a. Korišteni su samo pripravci kojima je istekao rok valjanosti od 5 dana, no čije skladištenje nije trajalo duže od 6 dana. U istraživanju su korišteni koncentrati trombocita krvne grupe AB+, s najmanje  $2 \times 10^{11}$  trombocita i smanjenim brojem leukocita. Koncentrati trombocita su proizvedeni standardnom „buffy coat“ metodom koja podrazumijeva centrifugiranje pune krvi i izdvajanje trombocitno-leukocitnog međusloja (*engl. buffy coat*, BC). Miješanjem jedne plazme i četiri BC različitih darivatelja, te dodatnim centrifugiranjem i leukofiltracijom supernatanta dobiva se tzv. „pool“ trombocita.

#### **4.2.2. Periferna krv**

Uzorci periferne krvi (PK) prikupljeni su od zdravih darivatelja. Mononuklearne stanice (MNS) izolirane iz uzoraka PK korištene su za ispitivanje imunomodulatornih svojstava MMS.

### **4.3. Metode**

#### **4.3.1. Priprema lizata ljudskih trombocita**

Vrećice s koncentratom trombocita pohranjene su na  $-80^{\circ}\text{C}$  tijekom najmanje 24 h. Potom je sadržaj vrećice otopljen u vodenoj kupelji na  $37^{\circ}\text{C}$ , raspodijeljen u polistirenske epruvete volumena 50 ml (Greiner, Njemačka) te centrifugiran na 3000 rpm tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Prikupljeni supernatant je potom filtriran kroz filtere veličine pora  $0,2\ \mu\text{m}$  (Sarstedt, Njemačka) i raspoređen u polistirenske epruvete volumena 15 ml (Greiner, Njemačka). Tako pripremljen lizat trombocita (LT) je dugotrajno pohranjen na  $-20^{\circ}\text{C}$  do trenutka upotrebe.

#### **4.3.2. Priprema medija za uzgoj MMS**

Uzgoj MMS se istovremeno provodio u tri uzgojna uvjeta. Osnovni medij za uzgoj MMS sadržavao je  $\alpha$ -modificirani minimalni esencijalni medij (*engl.  $\alpha$ - Minimum Essential Medium,  $\alpha$ -MEM*, Macopharma, Francuska), 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 1% otopine Penicillin-Streptomycin-Neomycin (Sigma-Aldrich, Njemačka). Ovako pripremljen medij je potom obogaćen s 10% FBS (Sigma-Aldrich, Njemačka), 10% LT ili 5% LT. U slučaju obogaćivanja s LT, mediju je dodano 2 IU/ml heparina (Belupo, Hrvatska).

#### **4.3.3. Izolacija MNS**

Uzorci KS i PK su razrijeđeni sterilnim kultivacijskim medijem RPMI1640 (Sigma-Aldrich, Njemačka) te pažljivo nadslojeni na sterilni medij Ficoll (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare, Švedska) gustoće 1,077 g/ml u polistirenskim epruvetama volumena 15 ml (Greiner, Njemačka). Omjer razrijeđene KS ili PK i medija Ficoll je bio 2:1. Uzorci su centrifugirani na 2020 rpm tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi, uz isključenu kočnicu centrifuge. Nakon centrifugiranja, na dodiru plazme i Ficolla stvorio se vidljiv sloj MNS koji je prikupljen pomoću sterilne Pasteurove pipete (Greiner, Njemačka). Izdvojene MNS su potom isprane u mediju RPMI1640 centrifugiranjem na 2300 rpm tijekom 3 minute. Talog MNS je resuspendiran u mediju RPMI1640 te su tehnikom svjetlosne mikroskopije određene vijabilnost i koncentracija stanica u suspenziji.

#### **4.3.4. Određivanje vijabilnosti i koncentracije stanica tehnikom svjetlosne mikroskopije**

Vijabilnost i koncentracija stanica određivane su brojanjem stanica u Bürker-Türkovoj komorici (Assistent, Njemačka) na svjetlosnom mikroskopu (Olympus, Japan). Za određivanje vijabilnosti, stanična suspenzija je pomiješana s tripanskim modrilom (Fluka,

Njemačka) u omjeru 1:1, te mikroskopirana u Bürker-Türkovoju komorici. Tripansko modrilo je supravitalna boja koja spontano prodire u mrtve stanice s narušenom strukturom stanične membrane te ih selektivno boji u plavo. Žive stanice s intaktnom membranom ne propuštaju boju u citoplazmu te ostaju neobojane. Nakon brojanja najmanje 100 stanica, vijabilnost je izražena kao udio živih stanica u ukupnom broju stanica.

$$\text{Vijabilnost (\%)} = \frac{\text{Broj živih stanica}}{\text{Ukupan broj stanica}} \times 100$$

Koncentracija stanica je određena miješanjem stanične suspenzije s Türkovom otopinom (Kemika, Hrvatska) u omjeru 1:1, brojanjem stanica u 16 kvadrata Bürker-Türkove komorice i korištenjem formule:

$$\text{Ukupna koncentracija stanica (ml}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Broj stanica} \times 2 \times 250000)}{16}$$

Türkova otopina sadrži octenu kiselinu koja lizira eritrocite, zbog čega su tijekom mikroskopiranja u komorici vidljivi samo leukociti.

Za određivanje koncentracije vijabilnih stanica korištena je sljedeća formula:

$$\text{Koncentracija vijabilnih stanica} = \text{Ukupna koncentracija stanica (ml}^{-1}\text{)} \times \text{Vijabilnost}$$

#### **4.3.5. Zamrzavanje MNS izoliranih iz KS**

Nakon izolacije iz KS, uzgoj MNS je nastavljen u kulturi *in vitro* dolje opisanom metodom, dok je ostatak stanica zamrznut u koncentraciji  $5\text{-}30 \times 10^6$  MNS/ml. Za zamrzavanje je korišten medij RPMI1640 (Sigma-Aldrich, Njemačka) uz dodatak 50% FBS (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 10% dimetil sulfoksida (DMSO, Wak-Chemie, Njemačka). Suspenzija MNS je prvo centrifugirana 3 minute na 2300 rpm, a stanični talog je resuspendiran u odgovarajućem volumenu FBS-a. Epruveta sa staničnom suspenzijom je zatim pohranjena na led, te joj je u pojedinačnim kapljicama dodavan medij RPMI1640 s DMSO-om uz neprekidno miješanje. Ovako pripremljena suspenzija MNS u mediju za zamrzavanje raspodijeljena je u epruvete volumena 2 ml (Greiner, Njemačka) prikladne za pohranu na niske temperature. Epruvete s MNS su odmah pohranjene na suhi led ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) te nakon 60 minuta premještene u tekući dušik ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4.3.6. Uzgoj stanica u kulturi *in vitro*

Izolirane MNS su nasadene u polistirenske kultivacijske posude površine 75 cm<sup>2</sup> (Greiner bio-one, Njemačka) u koncentraciji 0,16 x10<sup>6</sup> MNS/cm<sup>2</sup> u tri različita uzgojna medija i čuvane u inkubatoru (Heracell 150, Heraeus, Njemačka) u uvjetima apsolutne vlage, 5% CO<sub>2</sub> i temperaturi od 37°C. Nakon 48-72 h neadherirane stanice su uklonjene zamjenom medija svježim, a uzgoj stanica adheriranih za dno kultivacijske posude nastavljen je u opisanim uvjetima uz izmjenu pola volumena medija 2 puta tjedno. Nakon postizanja 80% konfluentnosti, uzgojna posuda s adheriranim stanicama je dva puta isprana fiziološkom otopinom puferiranom fosfatima (PBS, *engl. phosphate buffered saline*, Macopharma, Francuska) i podvrgnuta postupku tripsinizacije, tj. kidanju veza između stanica i plastične podloge pomoću 0,25%-tne otopine tripsina (Trypsin-EDTA, Sigma-Aldrich, Njemačka). Djelovanje tripsina je zaustavljeno nakon 3 minute dodavanjem PBS-a u omjeru 1:1, nakon čega je stanična suspenzija prikupljena iz kultivacijskih posuda u polistirenske epruvete volumena 50 ml i centrifugirana na 2300 rpm tijekom 3 minute. Stanice su resuspendirane u odgovarajućem uzgojnom mediju te je ranije opisanom tehnikom svjetlosne mikroskopije određena koncentracija vijabilnih stanica. Potom su stanice zasađene u kultivacijske posude površine 75 cm<sup>2</sup> u koncentraciji 1000 MMS/cm<sup>2</sup> (1. ciklus presađivanja; p1). Uzgoj stanica se nastavio do postizanja 80% konfluentnosti uz izmjenu pola volumena medija 2 puta tjedno, nakon čega su stanice tripsinizirane i ponovno presađene u koncentraciji 1000 MMS/cm<sup>2</sup> (2.ciklus presađivanja; p2). Presađivanje je ponavljano svakih 7-10 dana ukupno 5 puta (p1-p5) po svakom uzorku, a cilj je bio dobivanje homogene populacije MMS. Dio prikupljenih stanica se u svakom ciklusu presađivanja koristio za određivanje imunofenotipa i klonogenog potencijala stanica, a u pojedinim ciklusima za ispitivanje diferencijacijskog potencijala i imunomodulatornih svojstava te analizu kariotipa.

#### 4.3.7. Praćenje kinetike rasta MMS umnoženih *in vitro*

Kinetika rasta MMS tijekom uzgoja *in vitro* praćena je određivanjem broja udvostručenja stanične populacije.

Pritom se broj udvostručenja stanične populacije između dva uzastopna ciklusa presađivanja (*engl. population doubling*, PD) određivao korištenjem sljedeće formule:

$$PD = \frac{\log_{10} (NH) - \log_{10} (N1)}{\log_{10} (2)}$$

NH –broj prikupljenih stanica na kraju određenog ciklusa presađivanja

N1 –broj zasađenih stanica na početku istog ciklusa presađivanja

Na temelju dobivenih vrijednosti PD odredio se ukupan broj udvostručenja stanične populacije tijekom svih pet ciklusa presađivanja (p1-p5), odnosno kumulativno udvostručenje stanične populacije (*engl. cumulative population doubling, CPD*) tijekom ukupnog trajanja uzgoja u svakom od ispitivanih uvjeta.

Također je određeno prosječno vrijeme potrebno za jedno udvostručenje stanične populacije (*engl. population doubling time, PDT*) tijekom čitavog trajanja uzgoja korištenjem formule:

$$PDT (h) = \frac{\text{Ukupno trajanje uzgoja stanica (h)}}{CPD}$$

#### **4.3.8. Analiza imunofenotipa MMS tehnikom protočne citometrije**

Imunološka fenotipizacija rađena je na uzorcima MMS prikupljenima postupkom tripsinizacije u različitim ciklusima presađivanja kada je to bilo moguće (p1-p5). Imunofenotip je ispitivan pomoću mišjih monoklonskih protutijela obilježenih odgovarajućim fluorokromima; fikoeritriinom (*engl. phycoerythrin, PE* ili *RPE*,) ili fluorescein izotiocijanatom (*engl. fluorescein isothiocyanate, FITC*). Za potrebe ovog ispitivanja korištena su sljedeća monoklonska protutijela na ljudske leukocitne diferencijacijske antigene i njihove pripradajuće izotipske kontrole: anti-CD73 PE (BD Biosciences, SAD), anti-CD105 PE (Beckman Coulter, SAD), anti-CD90 FITC (Dako, Danska), anti-CD14 RPE (Dako, Danska), anti-CD19 RPE (Dako, Danska), anti-CD34 PE (BD Biosciences, SAD), anti-CD45 FITC (Dako, Danska), anti-HLA-DR RPE (Dako, Danska), IgG2a RPE (Dako, Danska), IgG1 RPE (Dako, Danska) i IgG1 FITC (Dako, Danska). Ukratko, prikupljene MMS su isprane centrifugiranjem u PBS-u kako bi se uklonio ostatak uzgojnog medija i tripsina. Vijabilnost i broj stanica određene su prethodno opisanom tehnikom svjetlosne mikroskopije. Koncentracija suspenzije MMS prilagođena je na  $0.5-1 \times 10^6$  MMS/ml. Potom je 100  $\mu$ l stanične suspenzije preneseno u polistirenske epruvete dimenzija 12x75 mm (BD Falcon, SAD) u koje je prethodno dodano odgovarajuće monoklonsko protutijelo. Stanice su inkubirane s protutijelima 20 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Suvišak protutijela je potom uklonjen centrifugiranjem i ispiranjem stanica s PBS-om. Nakon ispiranja, talog stanica je resuspendiran u 0,5 ml PBS-a te se odmah pristupilo analizi na protočnom citometru CYTOMICS FC500 (Beckman Coulter, SAD) uz pomoć računalnog programa FC500 CXP Software (Beckman Coulter, SAD). Po svakom uzorku je prilikom propuštanja kroz uređaj

prikupljeno najmanje 10000 stanica. Analizom intenziteta fluorescencije pojedinog fluorokroma vezanog za specifično monoklonsko protutijelo dobiven je udio stanica koje izražavaju pojedini biljeg u odnosu na cijelu populaciju analiziranih stanica. Nespecifično vezanje protutijela je oduzeto iz izračuna na osnovu rezultata dobivenih uz pomoć odgovarajućih izotipskih kontrola.

#### **4.3.9. Test ispitivanja klonogenog potencijala MMS**

U svakom ciklusu presađivanja stanica postavljen je test ispitivanja klonogenog potencijala MMS (*engl. colony-forming unit fibroblast, CFU-F*). U tu svrhu stanice su nasadene u plastične petrijeve posude dimenzija 100x20 mm (Corning, Njemačka) u koncentraciji 5 stanica/cm<sup>2</sup> u tri različita uzgojna medija. Uzgoj stanica je nastavljen u inkubatoru, u uvjetima apsolutne vlage, 5% CO<sub>2</sub> i temperaturi od 37°C uz izmjenu pola volumena medija 2 puta tjedno. Nakon 14 dana medij je u potpunosti uklonjen, a stanice adherirane za dno petrijeve posude tri puta isprane PBS-om (Macopharma, Francuska). Za fiksaciju stanica korištena je otopina acetona (Kemika, Hrvatska) i metanola (Kemika, Hrvatska) pripremljenih u omjeru 3:2. Nakon 15 minuta, stanice su osušene na zraku i tijekom 10 minuta rehidrirane destiliranom vodom, nakon čega im je dodana Mayerova hemalaun otopina (Merck, Njemačka) koja selektivno boji jezgre stanica u plavu boju. Nakon 10 minuta otopina je oprezno isprana vodovodnom vodom, a plavo obojane kolonije CFU-F makroskopski pobrojane.

#### **4.3.10. Test ispitivanja multipotentnosti MMS**

Na kraju drugog ciklusa presađivanja dio umnoženih MMS iskorišten je za ispitivanje multipotentnih svojstava uzgojenih stanica, odnosno njihovu sposobnost da se u uvjetima *in vitro* diferenciraju u adipocite odnosno osteoblaste. Stanice su zasađene u polistirenske kultivacijske posude s 6 bunarića (Corning, Njemačka) u koncentraciji 3000 MMS/cm<sup>2</sup> u odgovarajućem uzgojnom mediju. Nakon 24 h medij je uklonjen, a uzgoj stanica je nastavljen u odgovarajućem diferencijacijskom mediju. U dva bunarića uzgoj se provodio u mediju bez dodataka za poticanje diferencijacije te su navedene stanice služile kao kontrola. Stanice su čuvane u uvjetima apsolutne vlage, 5% CO<sub>2</sub> i temperaturi od 37°C uz izmjenu pola volumena medija 2 puta tjedno. Svaki put je pripreman svježi diferencijacijski medij.

Za poticanje adipogeneze stanice su uzgajane u odgovarajućem uzgojnom mediju uz dodatak 1 µM deksametazona (Krka, Slovenija), 5 µg/ml inzulina (Sigma-Aldrich, Njemačka), 50 µM indometacina (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 0,5 mM 3-izobutil-1-metilksantina (prema *engl.*



*3-isobutyl-1-methylxanthine*, IBMX, Sigma-Aldrich, Njemačka). Nakon 28 dana medij je uklonjen iz bunarića, a stanice su isprane PBS-om, fiksirane formalinom, inkubirane u 60%-tnom izopropanolu, te konačno obojane bojom Oil red O (Sigma-Aldrich, Njemačka) koja specifično boji lipide. Nakon uklanjanja Oil Red O, stanične jezgre su vizualizirane Mayerovom hemalaun otopinom (Merck, Njemačka) prema ranije opisanom protokolu. Zreli adipociti su identificirani promatranjem na invertnom mikroskopu AxioObserver.D1 (Zeiss, Njemačka) kao stanice s plavom jezgrom i vakuolom ispunjenom crveno obojanim lipidnim kapljicama.

Za poticanje osteogeneze stanice su uzgajane u odgovarajućem uzgojnom mediju uz dodatak 0,1  $\mu$ M deksametazona (Krka, Slovenija), 10 mM  $\beta$ -glicerol 2-fosfata (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 0,2 mM L-askorbinske kiseline (Sigma-Aldrich, Njemačka). Nakon 14 dana medij je uklonjen iz bunarića, a stanice su obojane prema metodi Von Kossa (124, 125). Ukratko, nakon ispiranja destiliranom vodom, stanice su izložene djelovanju otopine srebra nitrata (Kemika, Hrvatska) uz prisustvo snažnog snopa svjetlosti tijekom 60 minuta. Pod utjecajem svjetlosti dolazi do redukcije iona srebra u tamno metalno srebro koje se odlaže na mjestu nakupljanja kalcija čime se dokazuje prisustvo mineralnih depozita u ispitivanim uzorcima. Suvišak srebra je uklonjen dodavanjem natrijevog tiosulfata (Kemika, Hrvatska). Za vizualizaciju staničnih jezgara korištena je boja Nuclear fast red (Merck, Njemačka) tijekom 5 minuta. Zreli osteoblasti su identificirani promatranjem na invertnom mikroskopu AxioObserver.D1 (Zeiss, Njemačka) kao stanice s nakupinama crno obojanih mineralnih depozita.

#### **4.3.11. Citogenetska analiza kariotipa MMS**

Na kraju pojedinih ciklusa presađivanja dio stanica je iskorišten za potrebe analize kariotipa. U tu svrhu su stanice tri dana uzgajane u kultivacijskoj posudi površine 75 cm<sup>2</sup>, nakon čega im je dodan citostatik kolcemid (Colcemid, Serva, Njemačka) u konačnoj koncentraciji od 0,5  $\mu$ g/ml. Kolcemid sprječava stvaranje diobenog vretena te na taj način povećava broj metafaznih jezgara u staničnom uzorku. Nakon 3 sata inkubacije s kolcemidom, stanice su podvrgnute prethodno opisanom postupku tripsinizacije i resuspendirane u mediju RPMI1640 (Sigma-Aldrich, Njemačka). Dobivenoj staničnoj suspenziji je zatim dodana prethodno zagrijana 0,075 M hipotonična otopina kalij-klorida (Biognost, Hrvatska) koja uzrokuje bubrenje stanica, što omogućuje širenje i bolju vidljivost kromosoma tijekom kasnije izrade preparata. Hipotonija je prekinuta dodavanjem hladnog fiksativa prethodno pripremljenog

miješanjem metanola i ledene octene kiseline (Merck, Njemačka) u omjeru 3:1 koji uklanja staničnu citoplazmu te fiksira kromosome. Preparati za mikroskopiranje su pripremljeni prenošenjem stanične suspenzije u pojedinačnim kapljicama na hladna predmetna stakla, koja su potom osušena na sobnoj temperaturi. Preparati su zatim tretirani 0,25%-tnom otopinom tripsina (Trypsin EDTA, Sigma-Aldrich, Njemačka), a oprugavanje kromosoma izvršeno je G-metodom bojenja u otopini Giemse (Laboratorij Sven Šlaković, Hrvatska) i Sørensen fosfatnog pufera pH 7,1 u omjeru 1:4. Metoda se temelji na svojstvu boje Giemsa da na kromosomima stvara karakteristične pruge, budući da tamnije boji heterokromatinske regije koje su bogatije adeninom i timinom, dok manje kondenzirani kromatin koji je bogat citozinom i gvaninom ostaje slabije obojan. Numerička i strukturna analiza kromosoma provedena je u 12 do 20 metafaza po staničnom uzorku na mikroskopu BX51 (Olympus, Japan) uz primjenu računalnog programa CytoVision Master System za kariotipizaciju i fluorescencijsku hibridizaciju *in situ* (FISH) (Applied Imaging Corporation, SAD). Kao predložak za terminologiju i opis kariotipa korišten je ideogram Međunarodnog sustava za nomenklaturu u humanoj citogenetici (*engl. International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, ISCN) koji predstavlja shematski prikaz humanih kromosoma.

#### **4.3.12. Kemiluminiscencijski imunotest za određivanje proliferacije limfocita potaknute mitogenom u prisustvu MMS**

Na kraju drugog ciklusa presađivanja dio umnoženih MMS je iskorišten za ispitivanje njihovih imunomodulatornih svojstava, odnosno sposobnosti da suprimiraju proliferaciju limfocita potaknutu mitogenom fitohemaglutininom (*engl. phytohemagglutinin*, PHA, Gibco, SAD).

Kako bi se odredila odgovarajuća koncentracija mitogena potrebna za zadovoljavajuću proliferaciju limfocita, prethodno je učinjena titracija različitih koncentracija PHA (1%, 1,5%, 2,5%, 5%, 7,5% i 10%) u kultivacijskom mediju. Ukratko, PHA je dodavan u kultivacijski medij za uzgoj mononuklearnih stanica iz periferne krvi, te je učinak na proliferaciju limfocita utvrđen dolje opisanom metodom. Na temelju rezultata titracije je odlučeno da se u svim daljnjim testiranjima PHA u kultivacijski medij dodaje u koncentraciji od 1%.

Za ispitivanje utjecaja MMS na proliferaciju limfocita potaknutu s PHA, iz periferne krvi zdravih darivatelja izolirane su mononuklearne stanice (PK-MNS) ranije opisanom metodom centrifugiranja u gradijentu gustoće. PK-MNS su zasađene na mikrotitarske pločice tamne boje s 96 jažica prozirnog i ravnog dna (Greiner bio-one, Njemačka) u mediju RPMI1640

(Sigma-Aldrich, Njemačka) obogaćenom s 10% FBS (Sigma-Aldrich, Njemačka), 2 mM L-glutaminom (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 1% Penicillin-Streptomycin-Neomycinom (Sigma-Aldrich, Njemačka). Ista je vrsta medija korištena za resuspendiranje MMS nakon drugog ciklusa presađivanja (p2). Nakon određivanja vijabilnosti i koncentracije obje vrste stanica tehnikom svjetlosne mikroskopije, MMS su ozračene s 25 Gy u uređaju IBL 437 C (CIS bio international, Francuska) čime su stanice ostale vijabilne, ali je onemogućena njihova daljnja proliferacija.

Stanični uzorci su zasađeni u serijama od najmanje 6 ponavljanja. U seriji uzoraka koja je služila za ispitivanje imunomodulatornih svojstava MMS, u svaku je jažicu dodano  $1 \times 10^5$  PK-MNS/100  $\mu$ L stimuliranih s 1% PHA i  $1 \times 10^5$  MMS/100  $\mu$ L (omjer 1:1), dok je serija koja je služila kao pozitivna kontrola sadržavala samo  $1 \times 10^5$  PK-MNS/200  $\mu$ L stimuliranih s 1% PHA. Negativna kontrola kojom se određivala spontana proliferacija limfocita sadržavala je  $1 \times 10^5$  PK-MNS/200  $\mu$ L u uzgojnom mediju bez dodatka PHA, a negativna kontrola kojom se ispitalo da li ozračene MMS proliferiraju u prisustvu PHA sadržavala je  $1 \times 10^5$  MMS/200  $\mu$ L uz dodatak 1% PHA.

Za utvrđivanje razine stanične proliferacije u navedenim uzorcima korišten je enzimski imunotest ELISA (Cell Proliferation ELISA, BrdU, chemiluminescent, Roche, Njemačka). U tu svrhu su stanice uzgajane u inkubatoru u uvjetima apsolutne vlage, 5% CO<sub>2</sub> i temperaturi od 37°C tijekom 6 dana i tada obilježene dodavanjem 20  $\mu$ L 5-bromo-2'-deoksiuridina (BrdU) u svaku od jažica. BrdU je pirimidinski analog koji se tijekom stanične proliferacije ugrađuje na mjesto timidina u novosintetiziranim molekulama DNK. Nakon 24 h, pločica je centrifugirana na 1560 rpm 10 minuta, a medij uklonjen naglim istresanjem. Jažice su zatim sušene 15 minuta vrućim zrakom te inkubirane s otopinom FixDenat (200  $\mu$ L/jažici) tijekom 60 minuta. FixDenat fiksira stanice i uzrokuje denaturaciju DNK čime BrdU inkorporiran u DNK postaje dostupniji za vezivanje protutijela. Nakon uklanjanja FixDenata u svaku je jažicu dodano 100  $\mu$ L otopine anti-BrdU-POD (monoklonsko protutijelo konjugirano s peroksidazom). Nakon 90 minuta, otopina s protutijelom je uklonjena iz pločice naglim istresanjem, a svaka jažica isprana s 200  $\mu$ L otopine za ispiranje. Postupak ispiranja ponovljen je tri puta kako bi se osiguralo potpuno uklanjanje suviška nevezanog protutijela i povećala preciznost metode. Nakon dodavanja supstrata luminola (200  $\mu$ L/jažici), peroksidaza katalizira njegovu oksidaciju, a pritom nastaje pobuđeni produkt koji prilikom povratka u osnovno stanje emitira svjetlost (fotone). Pojava nastanka svjetlosti u enzimski kataliziranoj reakciji naziva se kemiluminiscencija. Nastali signal je multipliciran u čitaču mikrotitarskih

pločica s funkcijom luminometra Victor X3 (PerkinElmer, SAD) te kvantificiran u obliku relativnih svjetlosnih jedinica u sekundi (rlu/s) pomoću računalnih programa WorkOut 2.5 (PerkinElmer, SAD) i PerkinElmer 2030, v.4.00 (PerkinElmer, SAD). Očitane vrijednosti rlu/s su odražavale stupanj sinteze DNK, odnosno stanične proliferacije.

Dobiveni rezultati stanične proliferacije u raznim uzorcima izraženi su u odnosu na pripadajuću pozitivnu kontrolu (uvjet PK-MNS/PHA) zbog varijabilnosti u proliferativnom odgovoru limfocita različitih darivatelja nakon aktivacije mitogenom. Prosječna razina proliferacije mitogenom aktiviranih limfocita postignuta u prisustvu MMS (PK-MNS/PHA + MMS) umanjena je za stupanj proliferacije uzoraka koji su služili kao negativna kontrola (nestimulirani PK-MNS i MMS/PHA). Prosječna razina proliferacije mitogenom aktiviranih limfocita u prisustvu MMS izražavana je u odnosu na pozitivnu kontrolu korištenjem formule:

$$\% \text{ proliferacije} = \frac{[\text{PK-MNS/PHA} + \text{MMS}] - [\text{PK-MNS}] - [\text{MMS/PHA}] \text{ (rlu/s)}}{[\text{PK-MNS/PHA}] \text{ (rlu/s)}} \times 100$$

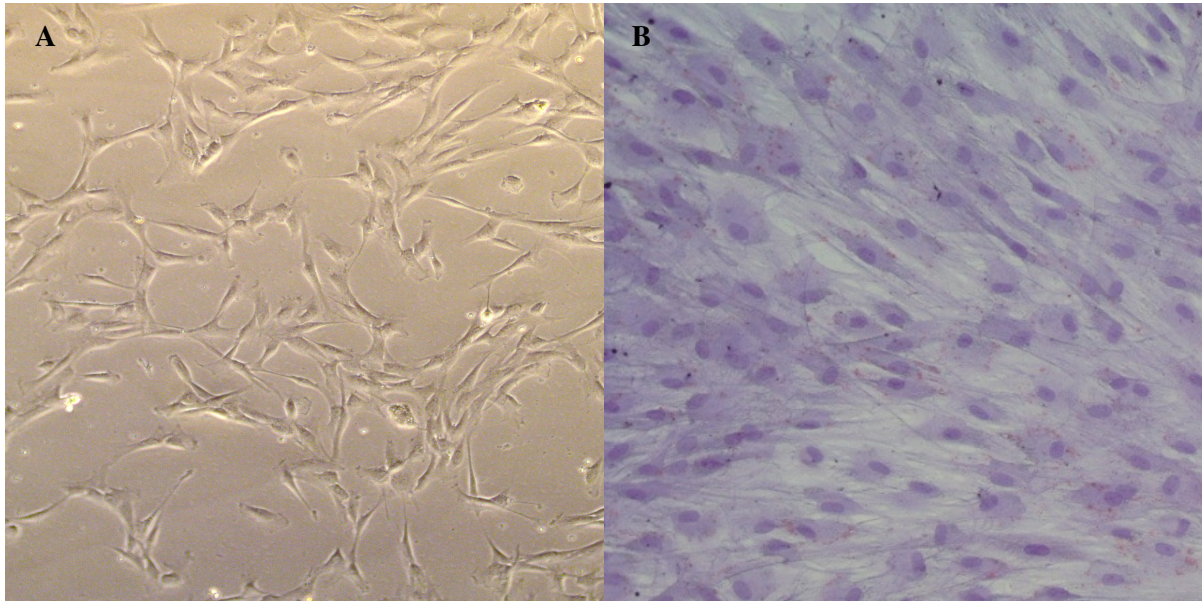
#### **4.3.13. Statistička obrada podataka**

U statističkoj obradi dobivenih rezultata korištene su prikladne metode deskriptivne statistike: medijan, aritmetička sredina, standardna devijacija (SD), standardna pogreška aritmetičke sredine (*engl. standard error of mean, SE*), raspon, najveća i najmanja vrijednost i prikladna grafička obilježja (126, 127). Za određivanje statističke značajnosti razlike značajki MMS u različim uzgojnim uvjetima korišten je *t* test za parne uzorke. Pripadajuća *p* vrijednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Morfološke značajke MMS uzgajanih *in vitro*

Tijekom uzgoja *in vitro* MMS su adherirale za plastičnu podlogu kultivacijske posude i izražavale morfologiju nalik fibroblastima koju karakterizira vretenasti oblik stanice s velikom ovalnom jezgrom (Slika 4). Morfologija stanica uzgajanih u različitim uzgojnim uvjetima (10% LT, 5% LT i 10% FBS) nije se značajnije razlikovala.



Slika 4. Morfologija MMS uzgojenih *in vitro*; **A** - nativno, **B** - obojano Mayerovom hemalaun otopinom.

### 5.2. Kinetika rasta umnoženih MMS

Kao izvor MMS korišteni su uzorci KS 15 darivatelja (9 muškaraca, 6 žena) starosti od 8-63 godina (medijan 23). U pet slučajeva MMS su umnažane u sva tri uzgojna uvjeta (10% LT, 5% LT i 10% FBS). U preostalim slučajevima zbog nedovoljnog broja stanica nije bilo moguće uzgojiti stanice u tri uzgojna uvjeta. Stoga su u dva slučaja stanice uzgajane u prisustvu 10% LT i 5% LT, a u jednom slučaju u prisustvu 10% LT i 10% FBS. Kod preostalih sedam darivatelja stanice su uzgajane samo u uzgojnom uvjetu s 10% LT.

Za određivanje kinetike rasta stanica pojedinog darivatelja na kraju svakog ciklusa presađivanja ( $p$ ) izračunato je kumulativno udvostručenje stanične populacije (CPD) u odnosu na početni broj stanica (Tablica 1). Broj ciklusa presađivanja stanica pojedinog darivatelja ovisio je o kinetici rasta i raspoloživom broju stanica. U većini slučajeva stanice su umnažane

do p4, a kada je to bilo moguće i do p5. Iznimno, kod tri darivatelja (D8, D9, D10) zbog slabe kinetike rasta nije bilo moguće nastaviti uzgoj stanica nakon p3.

Tablica 1. Kumulativno udvostručenje populacije MMS tijekom pojedinih ciklusa presađivanja u različitim uzgojnim uvjetima.

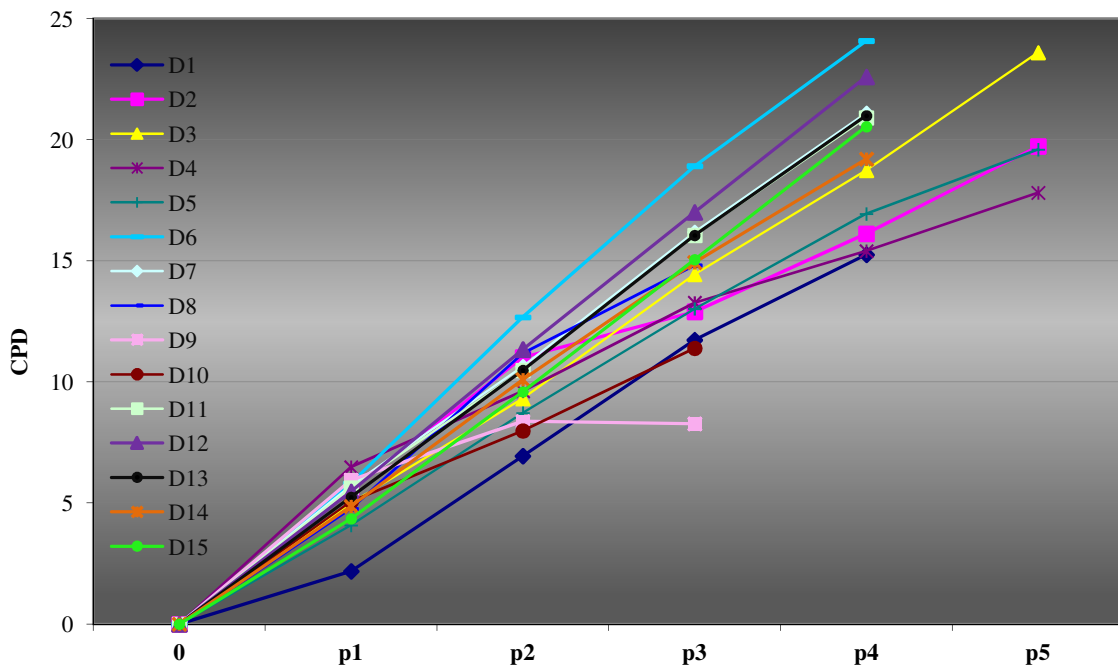
Darivatelj			10%LT					5%LT					10%FBS				
Spol	Dob		CPD					CPD					CPD				
			p1	p2	p3	p4	p5	p1	p2	p3	p4	p5	p1	p2	p3	p4	p5
D1	Ž	15	2,2	6,9	11,7	15,3		2,3	6,5	11,4	14,0		1,3	4,1	8,0	9,3	
D2	M	21	5,5	11,0	12,9	16,1	19,7	4,8	9,5	10,5	14,2	17,4					
D3	Ž	8	5,0	9,3	14,4	18,7	23,6	3,5	8,1	12,0	15,7	18,5	0,6	1,6	1,3	4,9	5,5
D4	Ž	18	6,5	9,6	13,3	15,4	17,8	2,0	3,3	3,0	6,5	4,0	2,0	3,7	3,4	5,4	
D5	M	23	4,1	8,7	13,0	16,9	19,6	1,1	3,5	4,4	3,8	3,6	0,1	2,3	7,0	8,7	
D6	M	20	5,8	12,7	18,9	24,1		5,3	12,9	14,7			3,4	7,6	15,4		
D7	Ž	22	5,7	10,6	16,2	21,1		4,7	9,4	13,8	19,3						
D8	M	33	4,8	11,2	14,8								2,3	2,8	2,9	5,5	
D9	Ž	63	6,0	8,4	8,3												
D10	M	53	5,1	8,0	11,4												
D11	M	52	5,6	10,5	16,1	20,9											
D12	Ž	19	5,5	11,3	17,0	22,6											
D13	M	28	5,2	10,5	16,1	21,0											
D14	M	32	4,9	10,1	14,9	19,2											
D15	M	32	4,4	9,6	15,1	20,5											
<b>Medijan</b>	<b>23</b>		<b>5,2</b>	<b>10,1</b>	<b>14,8</b>	<b>19,9</b>	<b>19,7</b>	<b>3,5</b>	<b>8,1</b>	<b>11,4</b>	<b>14,1</b>	<b>10,7</b>	<b>1,6</b>	<b>3,3</b>	<b>5,2</b>	<b>5,5</b>	<b>5,5</b>

*D* - darivatelj

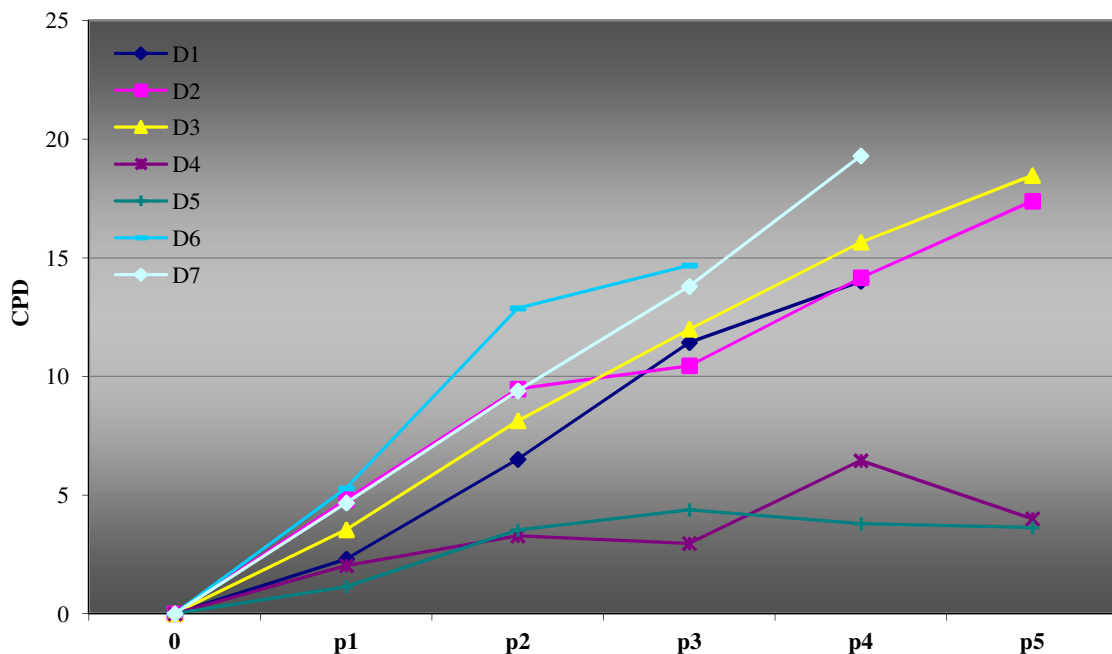
*p* - ciklus presađivanja

*CPD* - kumulativno udvostručenje stanične populacije

Na Slikama 5, 6 i 7 prikazana je kinetika rasta MMS svakog darivatelja u pojedinom uzgojnom uvjetu.

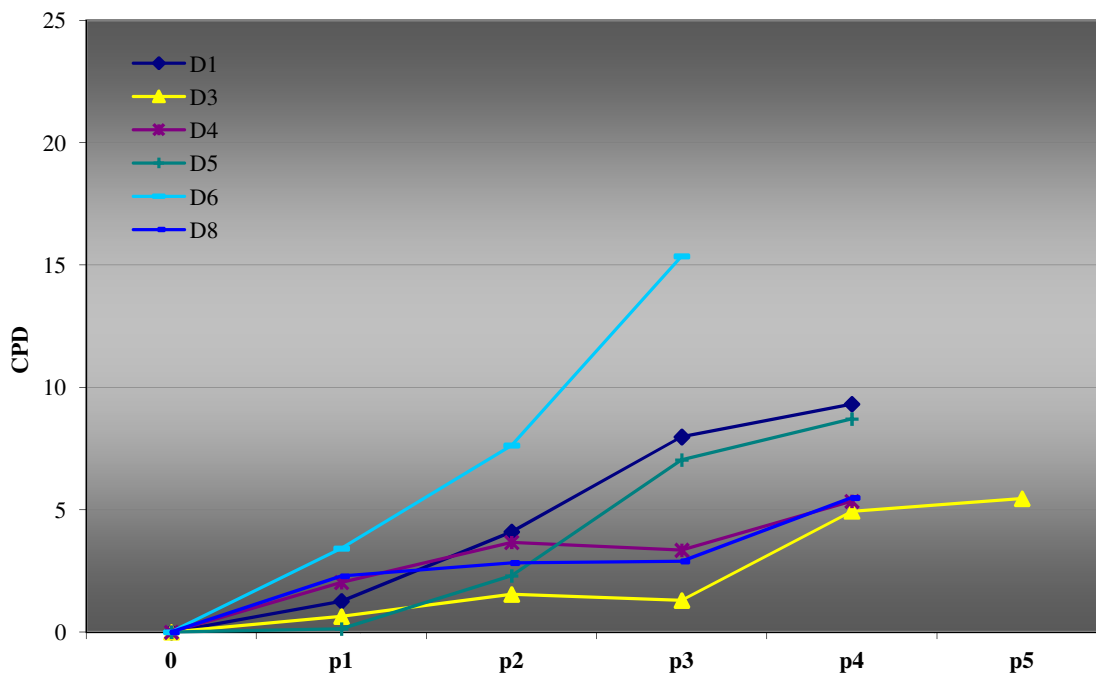


Slika 5. Kumulativno udvostručenje populacije MMS tijekom uzgoja u prisustvu 10% LT; CPD-kumulativno udvostručenje stanične populacije, D-darivatelj, p-ciklus presađivanja.



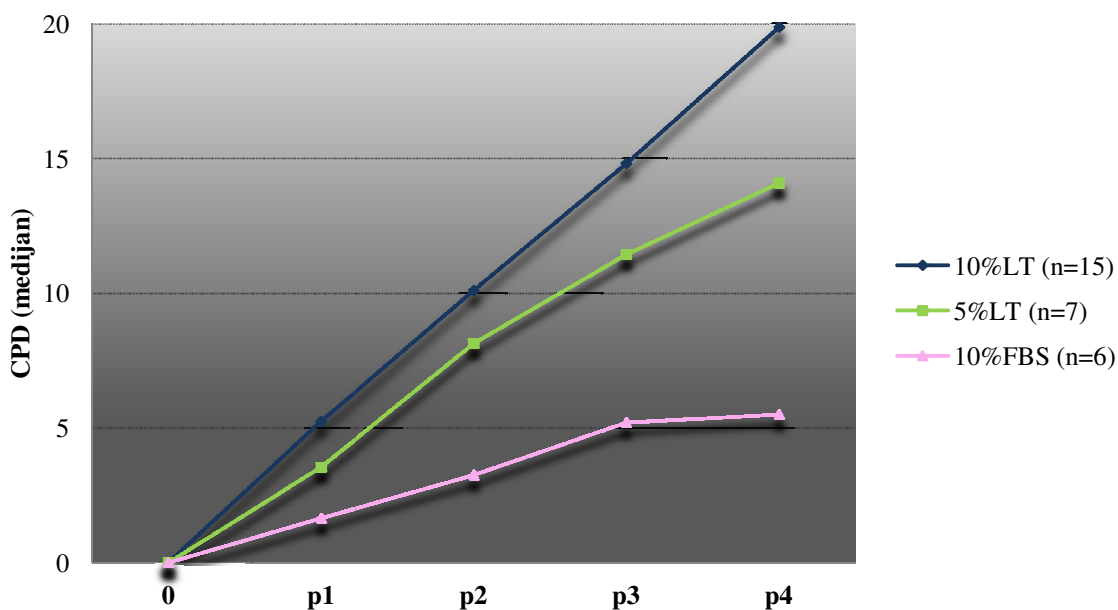
Slika 6. Kumulativno udvostručenje populacije MMS tijekom uzgoja u prisustvu 5% LT; CPD-kumulativno udvostručenje stanične populacije, D-darivatelj, p-ciklus presađivanja.





Slika 7. Kumulativno udvostručenje populacije MMS tijekom uzgoja u prisustvu 10% FBS; CPD-kumulativno udvostručenje stanične populacije, D-darivatelj, p-ciklus presađivanja.

Nije uočena povezanost spola i dobi darivatelja s kinetikom rasta MMS *in vitro*. Međutim, utvrđen je značajni utjecaj uzgojnog uvjeta na vrijednosti CPD uzgojenih stanica (Slika 8, Tablica 2).



Slika 8. Zbirno kumulativno udvostručenje populacije MMS uzgojenih u različitim uzgojnim uvjetima (medijan); CPD-kumulativno udvostručenje stanične populacije, p-ciklus presađivanja.

Tablica 2. Statistička značajnost razlike kumulativnog udvostručenja (CPD) populacije MMS u različitim uzgojnim uvjetima određena *t* testom za parne uzorke u pojedinim ciklusima presađivanja.

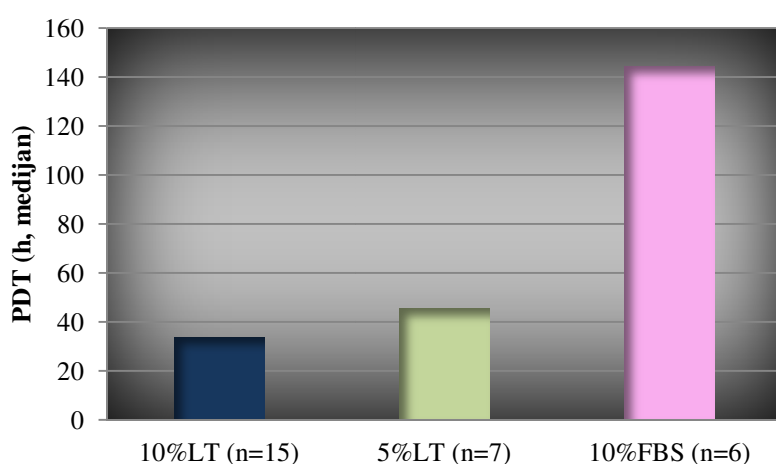
Usporedba uzgojnih uvjeta	<i>p</i> vrijednost			
	p1	p2	p3	p4
10%LT i 10%FBS (n=6)	0,001	0,0003	0,003	0,005
5%LT i 10%FBS (n=5)	0,024	0,039	0,215	0,221
10%LT i 5%LT (n=7)	0,020	0,027	0,010	0,027

*n* - broj ispitanih parova uzoraka

p1-p4 - ciklus presađivanja

*p*<0,05 - statistički značajna razlika

Usporedba vrijednosti CPD stanica umnoženih u tri uzgojna uvjeta je pokazala da su stanice rasle značajno sporije u prisustvu 10% FBS u odnosu na oba uzgojna uvjeta s LT. Za uzgojni uvjet s 10% LT navedena je razlika bila statistički značajna u sva četiri ciklusa presađivanja, a za uzgojni uvjet s 5% LT samo u prva dva ciklusa presađivanja. Koncentracija LT u uzgojnom mediju također je utjecala na vrijednost CPD te je rast stanica u svim ciklusima presađivanja bio statistički značajno bolji u prisustvu 10% LT u odnosu na uzgojni uvjet s 5% LT. Kinetika rasta MMS je, nadalje, praćena i određivanjem prosječnog vremena potrebnog za jedno udvostručenje stanične populacije (PDT) tijekom čitavog trajanja uzgoja *in vitro*. Prosječno vrijeme potrebno za jedno udvostručenje stanične populacije bilo je kraće tijekom uzgoja u mediju s 10% LT (33,8 h) i 5% LT (45,5 h) u odnosu na 144,5 h koliko je prosječno iznosilo u uzgojnom uvjetu s 10% FBS (Slika 9).



Slika 9. Prosječno vrijeme potrebno za jedno udvostručenje stanične populacije (PDT) u tri uzgojna uvjeta.

Međutim, *t* testom za parne uzorke statistički značajna razlika utvrđena je samo između parova uzoraka uzgajanih u prisustvu 10% LT i 10% FBS ( $p=0,005$ ) (Tablica 3).

Tablica 3. Statistička značajnost razlike prosječnog vremena potrebnog za jedno udvostručenje stanične populacije (PDT) u različitim uzgojnim uvjetima određena *t* testom za parne uzorke.

Usporedba uzgojnih uvjeta	<i>p</i> vrijednost
10%LT i 10%FBS (n=6)	0,005
5%LT i 10%FBS (n=5)	0,261
10%LT i 5%LT (n=7)	0,079

*n* - broj ispitanih parova uzoraka

$p < 0,05$  - statistički značajna razlika

### 5.3. Analiza imunofenotipa MMS umnoženih *in vitro*

Imunofenotip stanica umnoženih *in vitro* analiziran je tehnikom protočne citometrije kako bi se utvrdila čistoća uzgojene populacije MMS. Stanični uzorci su analizirani u raznim ciklusima presađivanja kada je broj umnoženih stanica bio zadovoljavajući za izvođenje svih planiranih testova. Budući da je cilj istraživanja bio istražiti biološke značajke MMS u prisustvu LT te da je najveća kinetika staničnog rasta zabilježena u uzgojnom uvjetu s 10% LT, protočnocitometrijska analiza je najčešće izvršena na stanicama uzgojenim upravo u tom uzgojnom uvjetu.

Prema smjernicama Međunarodnog društva za staničnu terapiju (ISCT), homogenom se smatra ona populacija MMS u kojoj  $\geq 95\%$  stanica izražava biljege karakteristične za MMS, dok je istovremeno izražaj biljega krvotvorne loze  $\leq 2\%$ . Analiza imunofenotipa stanica umnoženih u prisustvu 10% LT prikupljenih nakon prvog ciklusa presađivanja pokazala je da je udio stanica koje izražavaju biljege CD73, CD90 i CD105, karakteristične za MMS, u prosjeku iznosio 88%, što znači da stanična populacija još uvijek nije bila u potpunosti homogena (Tablica 4). Međutim, već na kraju drugog ciklusa presađivanja, udio stanica s izražajem biljega karakterističnih za MMS prosječno je iznosio 97%, što je ukazivalo na homogenost stanične populacije, a isto je dokazano i protočnocitometrijskom analizom i u svim sljedećim ciklusima presađivanja ( $p_2$ - $p_5$ ).

Tablica 4. Srednja vrijednost izražaja biljega karakterističnih za populaciju MMS umnoženih u različitim ciklusima presađivanja u prisustvu 10% LT.

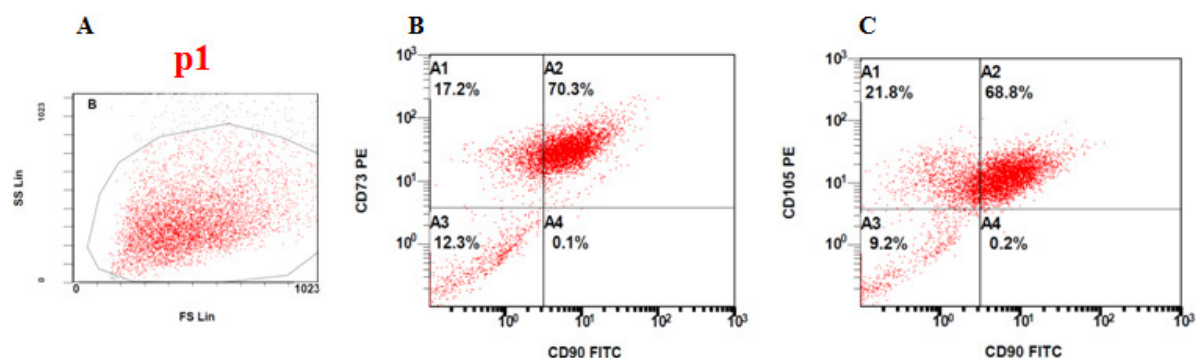
Izražaj biljega (%)	p1 (n=8)	p2 (n=13)	p3 (n=15)	p4 (n=12)	p5 (n=7)
CD73	87	99	97	99	99
CD90	88	97	97	96	99
CD105	89	96	98	98	99

n - broj darivatelja

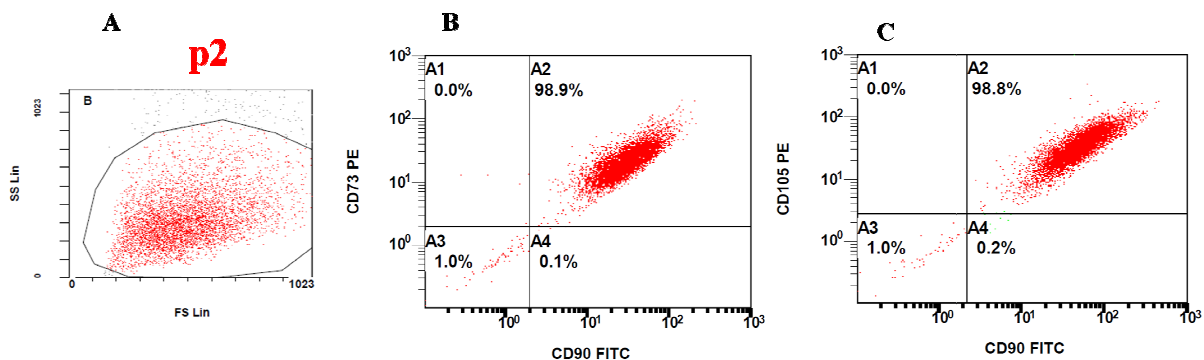
p1-p5 - ciklus presađivanja

Karakterističan imunofenotip MMS, pored očekivanog izražaja prethodno navedenih biljega, podrazumijeva i izostanak izražaja biljega krvotvorne loze poput CD34, CD45, CD14, CD19 i HLA-DR. U svim ispitanim uzorcima umnoženih stanica raznih darivatelja u drugom ciklusu presađivanja dobivena je populacija stanica u kojoj je izražaj biljega krvotvorne loze bio  $\leq 2\%$  te se takav stabilno održavao tijekom svih kasnijih ciklusa presađivanja (p2-p5).

Primjeri analize imunofenotipa stanica umnoženih iz KS darivatelja D12 prikazani su na Slikama 10 i 11. Iz prikaza je vidljivo da stanice navedenog darivatelja na kraju p1 ne predstavljaju u potpunosti homogenu populaciju MMS za razliku od stanica istog darivatelja u p2.

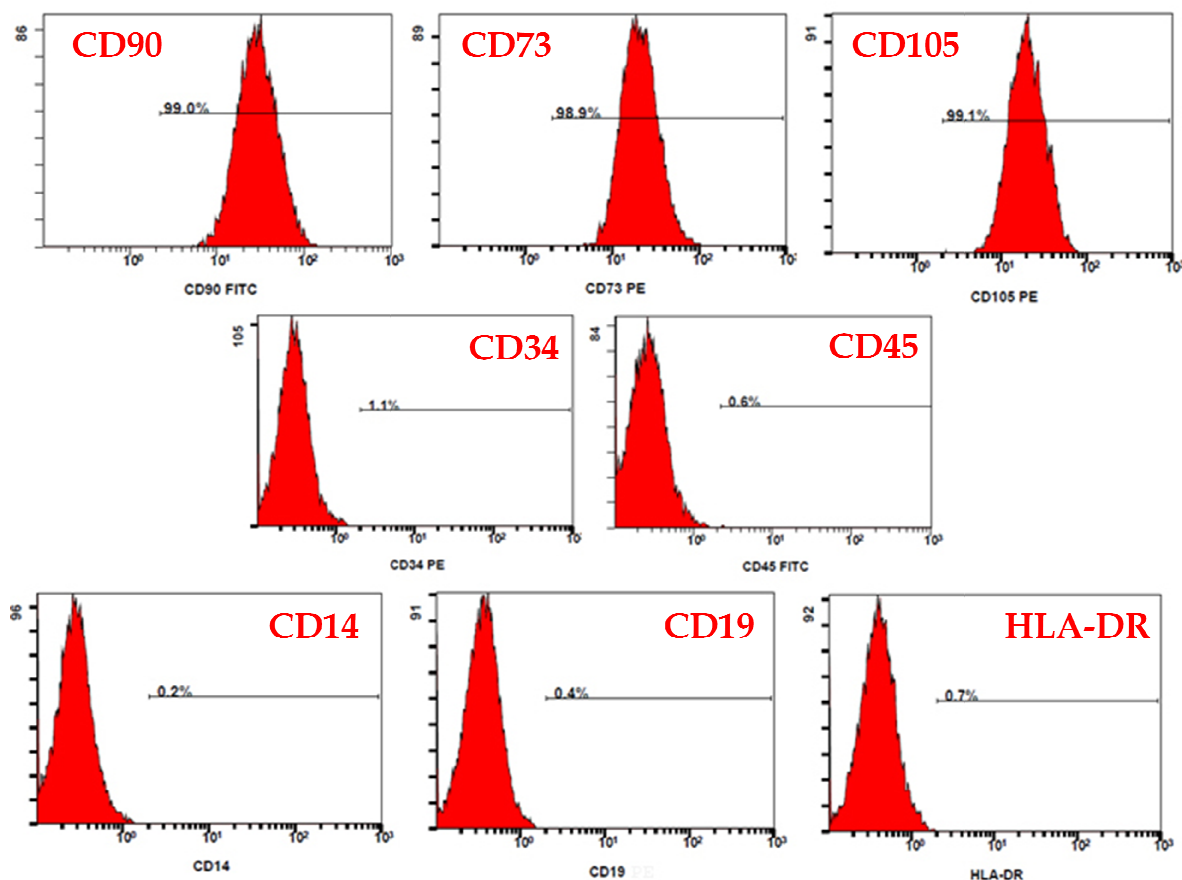


Slika 10. Protočnociometrijski prikaz umnoženih stanica darivatelja D12 u p1. **A** – dvoparametrijski prikaz fizikalnih osobina stanica umnoženih u p1. Veličina stanica određena je pomoću detektora FSC (*engl. forward scatter*), a zrnatost pomoću detektora SSC (*engl. side scatter*). Na prikazanom citogramu vidljiv je početak formiranja homogene populacije velikih svjetlih stanica. **B** – dvoparametrijski prikaz fluorescencije stanica obilježenih s protutijelima anti-CD90 FITC i anti-CD73 PE. **C** – dvoparametrijski prikaz fluorescencije stanica obilježenih protutijelima anti-CD90 FITC i anti-CD105 PE. Populacija stanica koja je vezala oba protutijela predstavlja ciljnu populaciju MMS i vidljiva je u A2 kvadrantu prikazanih citograma.



Slika 11. Protočnociometrijski prikaz umnoženih stanica darivatelja D12 u p2. **A** – dvoparametrijski prikaz fizikalnih osobina stanica umnoženih u p2. Veličina stanica određena je pomoću detektora FSC, a zrnatost pomoću detektora SSC. Na prikazanom citogramu vidljiva je homogena populacija velikih svjetlih stanica. **B** – dvoparametrijski prikaz fluorescencije stanica obilježenih s protutijelima anti-CD90 FITC i anti-CD73 PE. **C** – dvoparametrijski prikaz fluorescencije stanica obilježenih protutijelima anti-CD90 FITC i anti-CD105 PE. Populacija stanica koja je vezala oba protutijela predstavlja ciljnu populaciju MMS i vidljiva je u A2 kvadrantu prikazanih citograma.

Primjer karakterističnog imunofenotipa MMS stanica dobiven u p2 prikazan je na Slici 12.

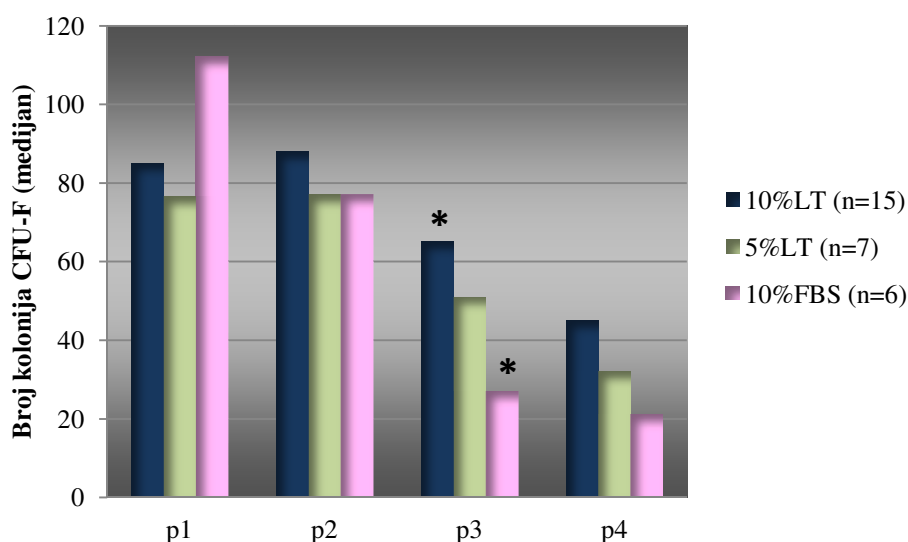


Slika 12. Protočnociometrijski prikaz umnoženih stanica darivatelja D12 u p2. Jednoparametrijski prikazi fluorescencije stanica (histogrami) u kojima je intenzitet fluorescencije stanica s vezanim protutijelom izražen u odnosu na broj analiziranih stanica. Fluorescentni signali koji se detektiraju na

detektorima za fluorescenciju potječu od fluorokroma vezanih za protutijelo. Iz prikaza je vidljivo da umnožene stanice u p2 izražavaju imunofenotip karakterističan za homogenu populaciju MMS.

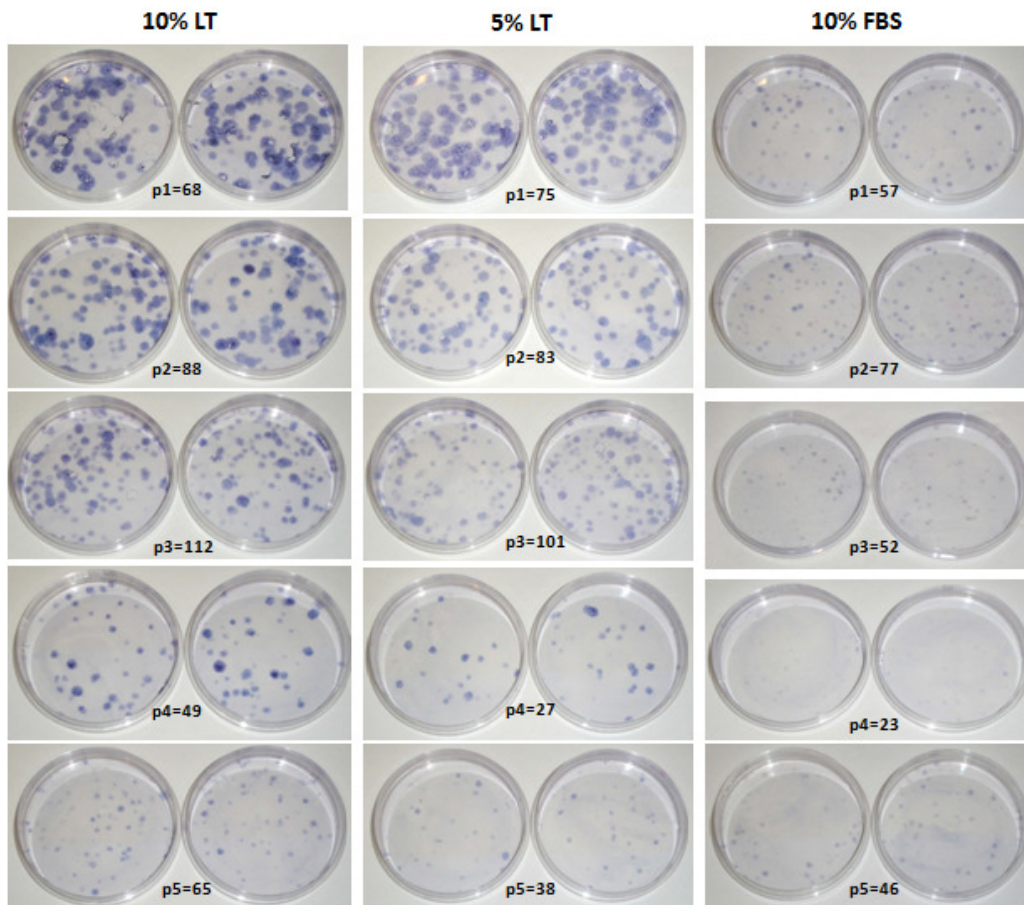
#### 5.4. Klonogeni potencijal MMS umnoženih *in vitro*

Klonogeni potencijal MMS u svakom se ciklusu presađivanja ispitivao testom CFU-F (*engl. colony-forming unit fibroblast*) brojanjem naraslih kolonija CFU-F. Uz iznimku prvog ciklusa presađivanja, kada je najveći broj kolonija CFU-F zabilježen u prisustvu 10% FBS, u svim ostalim ciklusima presađivanja broj kolonija CFU-F je bio veći u prisustvu 10% LT i 5% LT te se smanjivao sa svakim sljedećim ciklusom presađivanja (Slika 13). Statistički značajna razlika u broju kolonija CFU-F utvrđena je jedino u p3 između uzgojnih uvjeta 10% LT i 10% FBS ( $p=0,008$ ).



Slika 13. Broj kolonija CFU-F (medijan) u pojedinim ciklusima presađivanja u različitim uzgojnim uvjetima. Statistički značajne razlike među skupinama određene su *t* testom za parne uzorke; *p* vrijednosti manje od 0,05 smatrale su se statistički značajnima. \*-statistički značajna razlika utvrđena je između uzgojnih uvjeta 10% LT i 10% FBS ( $p=0,008$ ).

Osim brojem, kolonije CFU-F su se u pojedinim uzgojnim uvjetima razlikovale i po svojim morfološkim značajkama (Slika 14). Tako je kod svih darivatelja uočeno da su kolonije CFU-F koje su rasle u oba uzgojna uvjeta s LT bile mnogo veće od onih naraslih u prisustvu FBS-a, što je bilo zamjetno u svim ciklusima presađivanja. Također, nakon bojanja s Mayerovom hemalaun otopinom, kolonije CFU-F narasle u prisustvu LT uvijek su bile mnogo intenzivnije obojane u odnosu na kolonije narasle u prisustvu FBS-a.

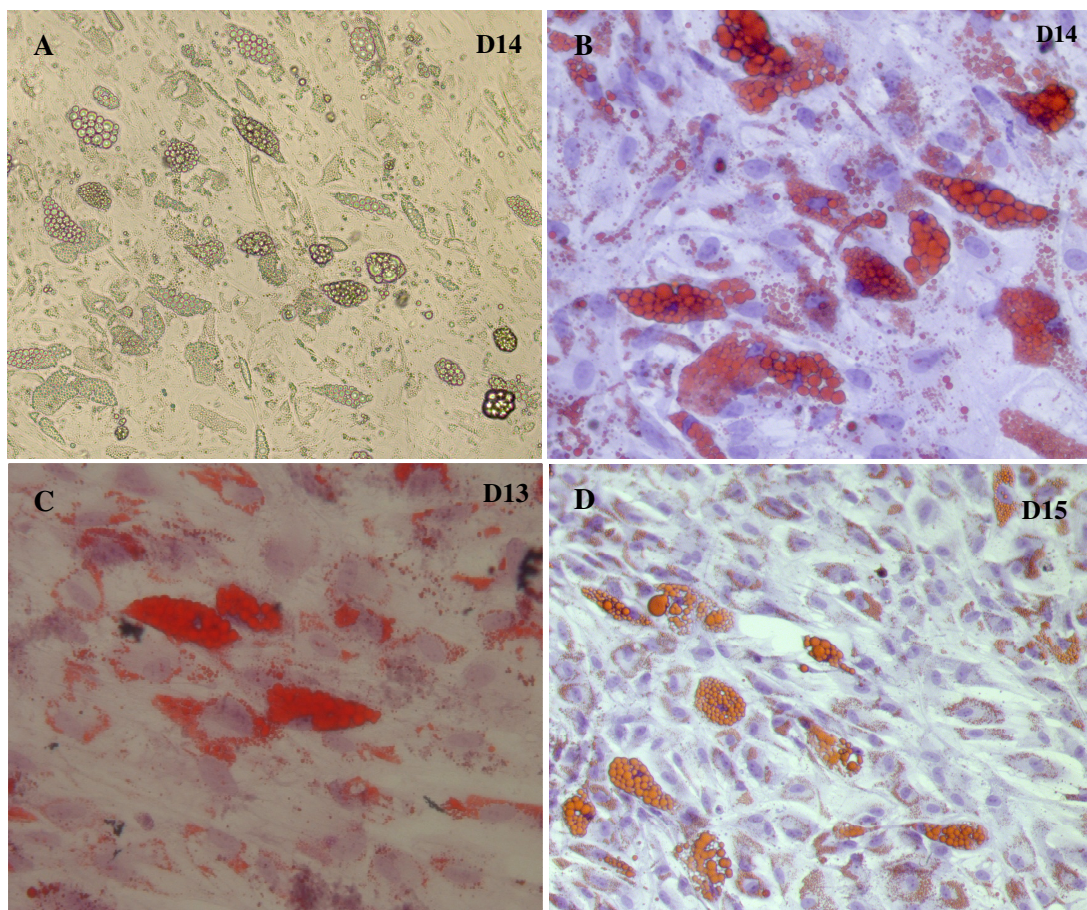


Slika 14. Razlike u broju i morfologiji kolonija CFU-F nakon uzgoja MMS u tri uzgojna uvjeta (darivatelj D1, obojano Mayerovom hemalaun otopinom).

### 5.5. Diferencijacija MMS uzgojenih *in vitro*

Da bi se dokazala multipotentnost uzgojenih MMS, stanice su u *in vitro* uvjetima potaknute na diferencijaciju u adipocite i osteoblaste. Kada je to broj umnoženih stanica omogućavao, diferencijacija je potaknuta u različitim uzgojnim uvjetima.

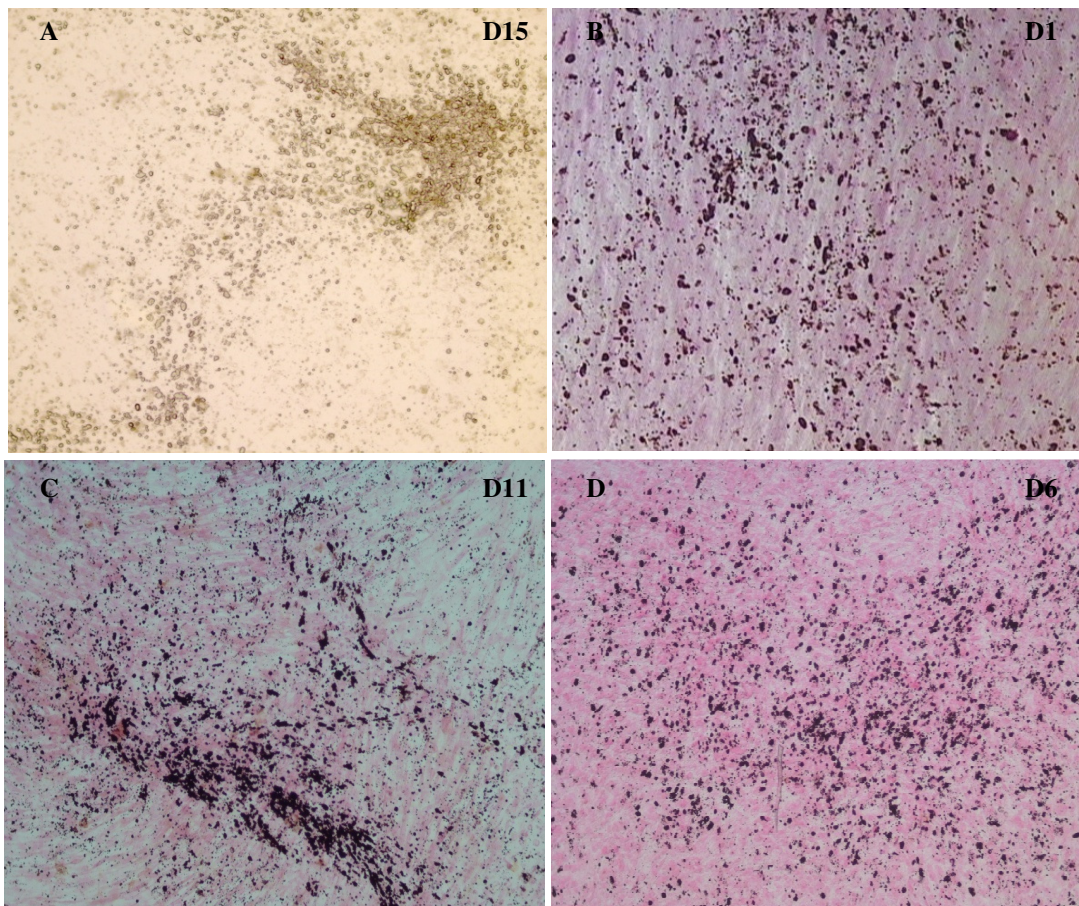
Adipogeneza je potaknuta u sva tri uzgojna uvjeta kod jednog darivatelja. U slučaju tri darivatelja MMS su diferencirane u adipocite u prisustvu 10% LT i 5% LT, u jednom slučaju u prisustvu 10% LT i 10% FBS, a u preostalim pet slučajeva samo u prisustvu 10% LT. Adipociti uzgojeni *in vitro* su imali karakterističnu morfologiju masne stanice s velikim brojem lipidnih kapljica koje su ispunjavale najveći dio stanične citoplazme (Slika 15A). Lipidi su dokazani bojom Oil Red O kojom su kapljice obojane crveno, dok su stanične jezgre obojane plavo pomoću Mayerove hemalaun otopine (Slike 15B, 15C i 15D).



Slika 15. Adipociti uzgojeni *in vitro* (A – nativno; B,C,D - obojano s Oil Red O i Mayerovom hemalaun otopinom). Povećanje 20x.

Osteogeneza je kod tri darivatelja potaknuta u prisustvu 10% LT i 5% LT, a u preostalih osam samo u prisustvu 10% LT. Osteoblasti uzgojeni *in vitro* su imali izduženi oblik stanice s oštrim rubovima (Slika 16A). Mineralni depoziti vizualizirani su bojanjem metodom von Kossa kao tamne nakupine vidljive na slikama 16B, 16C i 16D.

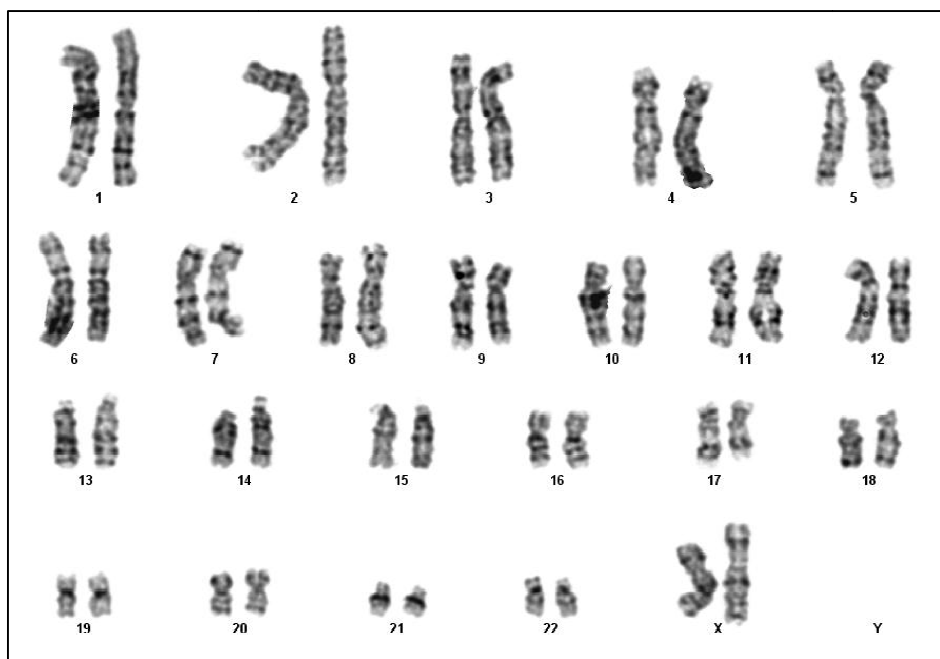




Slika 16. Osteoblasti uzgojeni *in vitro* (A – nativno; B, C, D - obojano metodom Von Kossa). Povećanje 10x.

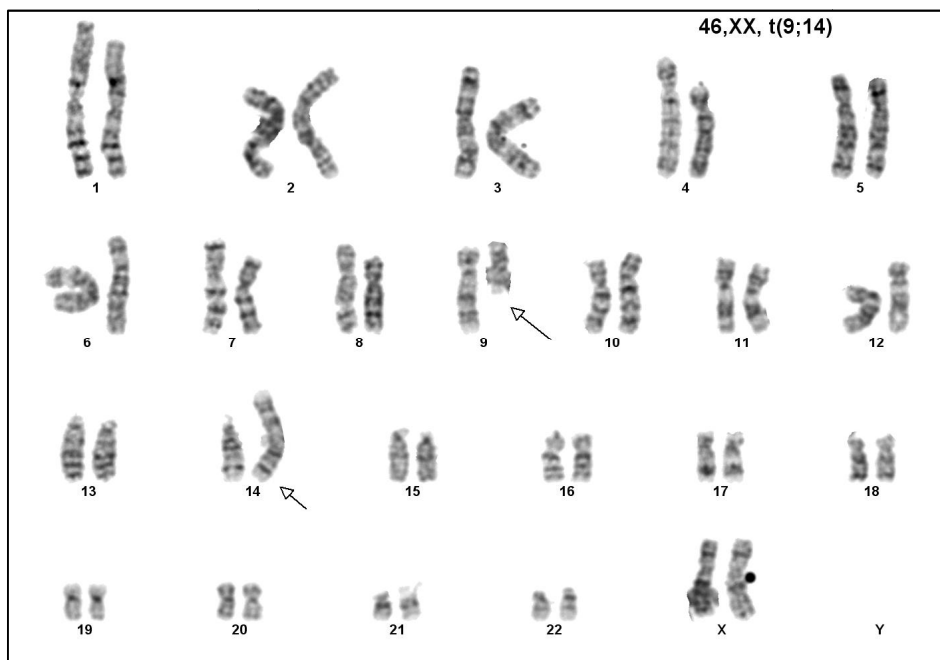
### 5.6. Analiza kariotipa MMS umnoženih *in vitro*

Kariotip je analiziran na uzorcima MMS uzgojenim iz KS 12 različitih darivatelja. Analiza je u svakom uzorku izvršena na 12 do 20 metafaznih jezgara, prikupljenih najčešće u trećem i/ili četvrtom ciklusu presađivanja. U slučaju jednog darivatelja analiziran je kariotip stanica uzgajanih u sva tri uzgojna uvjeta (10% LT, 5% LT i 10% FBS), dok je kod preostalih darivatelja analiza izvršena na MMS koje su uzgajane u dva (10% LT i 5% LT; n=4) ili u samo jednom uzgojnom uvjetu (10% LT; n=7). Većina analiziranih metafaznih jezgara imala je uredan kariotip (Slika 17).



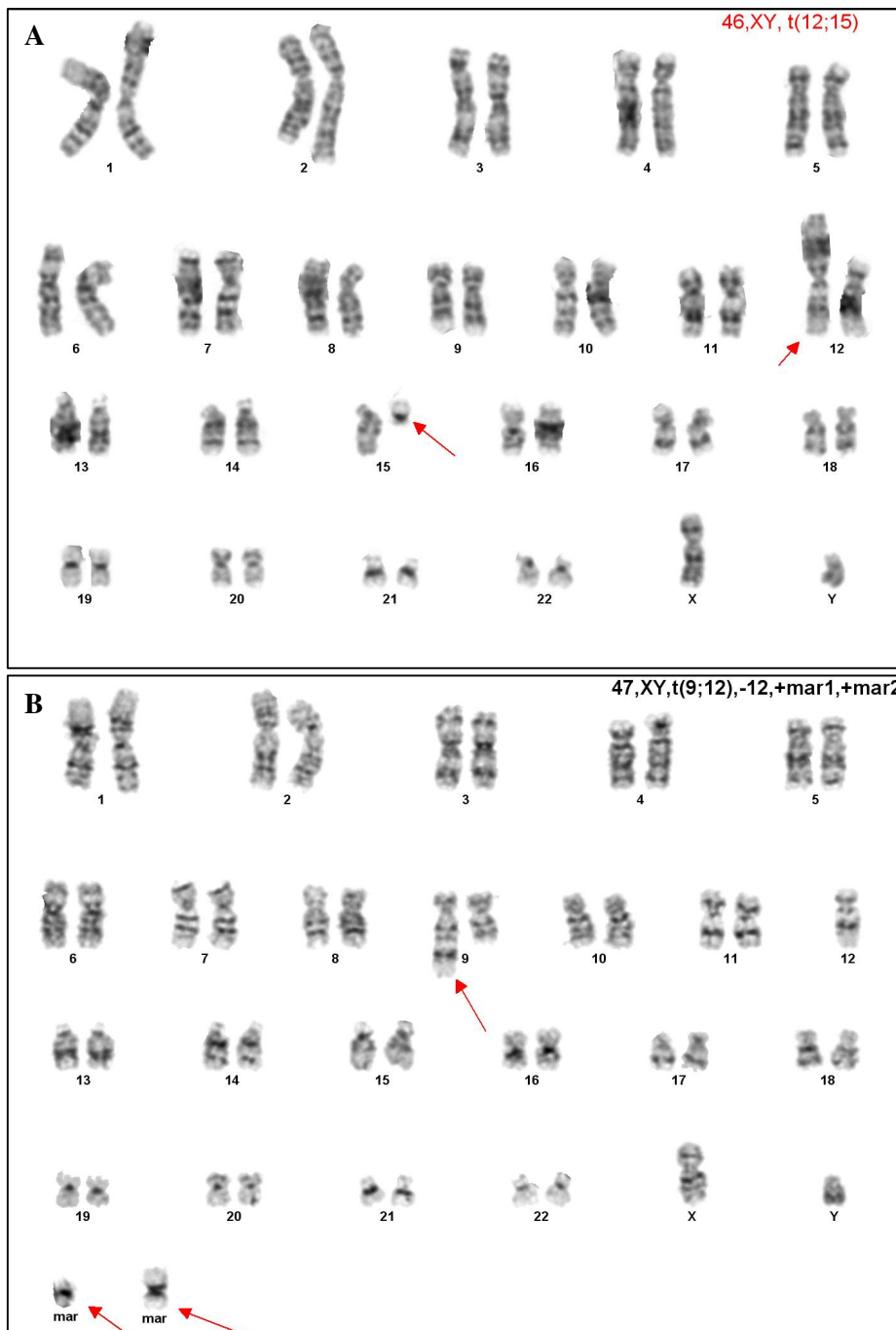
Slika 17. Uredan kariotip MMS umnažanih *in vitro* u prisustvu 10% LT (D12, p2)

Međutim, u tri su metafazne jezgre utvrđene promjene u strukturi kromosoma. U jezgri jedne od analiziranih stanica darivatelja D7 koje su bile uzgajane u prisustvu 5% LT, u trećem je ciklusu presađivanja utvrđena translokacija  $t(9;14)$  (Slika 18). Navedena kromosomska aberacija nije utvrđena kod stanica istog darivatelja uzgojenih u prisustvu 10% LT.



Slika 18. Kromosomska translokacija  $t(9;14)$  u jezgri MMS darivatelja D7 utvrđena tijekom umnažanja *in vitro* u prisustvu 5% LT (p3)

U slučaju darivatelja D6, kromosomske su promjene utvrđene u trećem ciklusu presađivanja u oba uzgojna uvjeta s LT.



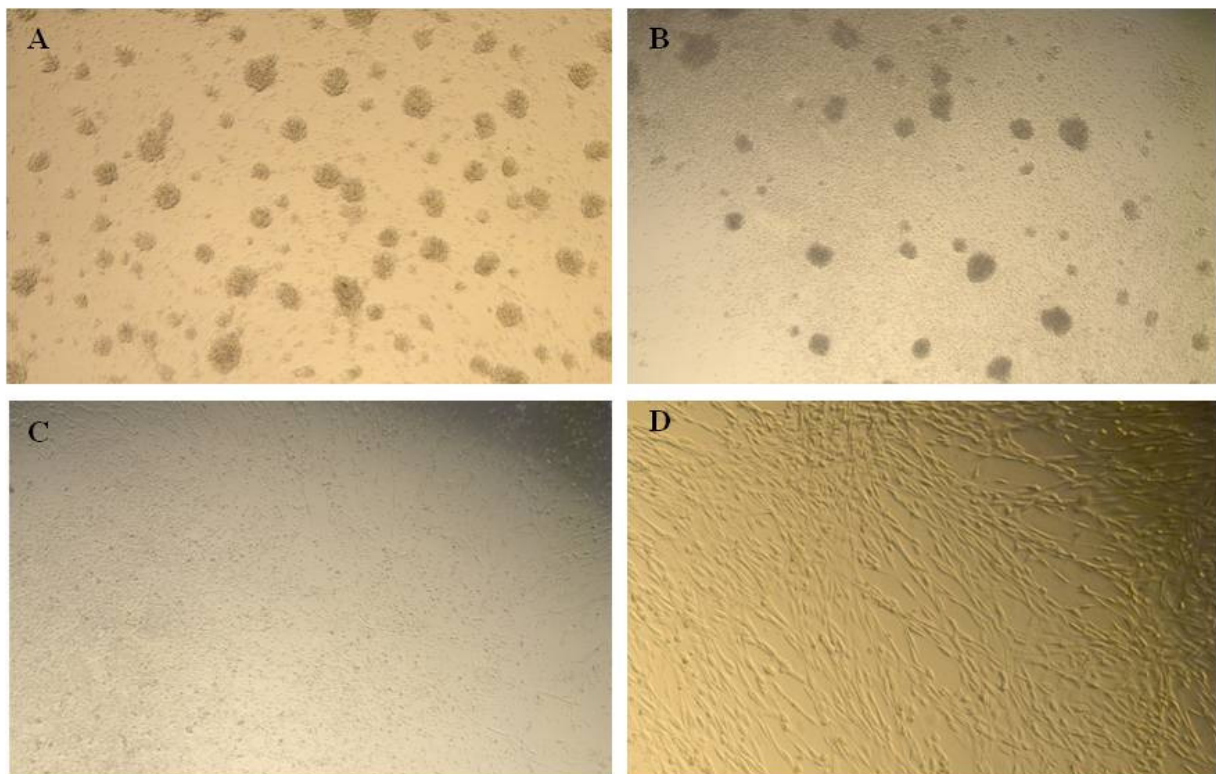
Slika 19. Kromosomske promjene u jezgrama MMS darivatelja D6 tijekom umnažanja *in vitro* (A – 10%LT, p3; B – 5%LT, p3)

U MMS uzgojenim u prisustvu 10% LT u jednoj je jezgri utvrđena translokacija t(12;15) (Slika 19A), dok je jezgra jedne od stanica uzgajanih u prisustvu 5% LT sadržavala translokaciju t(9;12), ali i dodatne kromosomske promjene (Slika 19B). Naime, u navedenoj

je staničnoj jezgri ujedno nedostajao jedan kromosom 12, te su utvrđena dva marker kromosoma nepoznatog podrijetla. Kako je ova promjena utvrđena u samo jednoj od ispitivanih jezgara, nije ju bilo moguće analizirati dodatnim analitičkim tehnikama poput fluorescencijske hibridizacije *in situ* (FISH), pa stoga nije jasno je li riječ o nebalansiranoj translokaciji ili nekoj drugoj vrsti kromosomske aberacije.

### 5.7. Imunomodulatorna svojstva MMS umnoženih *in vitro*

Kako bi se ispitala sposobnost MMS umnoženih *in vitro* da suprimiraju proliferaciju limfocita potaknutu mitogenom fitohemaglutininom (PHA), ozračene MMS su dodavane u kulturu mononuklearnih stanica izoliranih iz periferne krvi zdravih darivatelja (PK-MNS) u omjeru 1:1. Ispitana su imunomodulatorna svojstva MMS pet darivatelja (D6, D7, D12, D14, D15). Učinak MMS na proliferaciju mitogenom aktiviranih limfocita mogao se pratiti vizualno mikroskopiranjem mikrotitarske pločice s ispitivanim staničnim uzorcima (Slika 20).

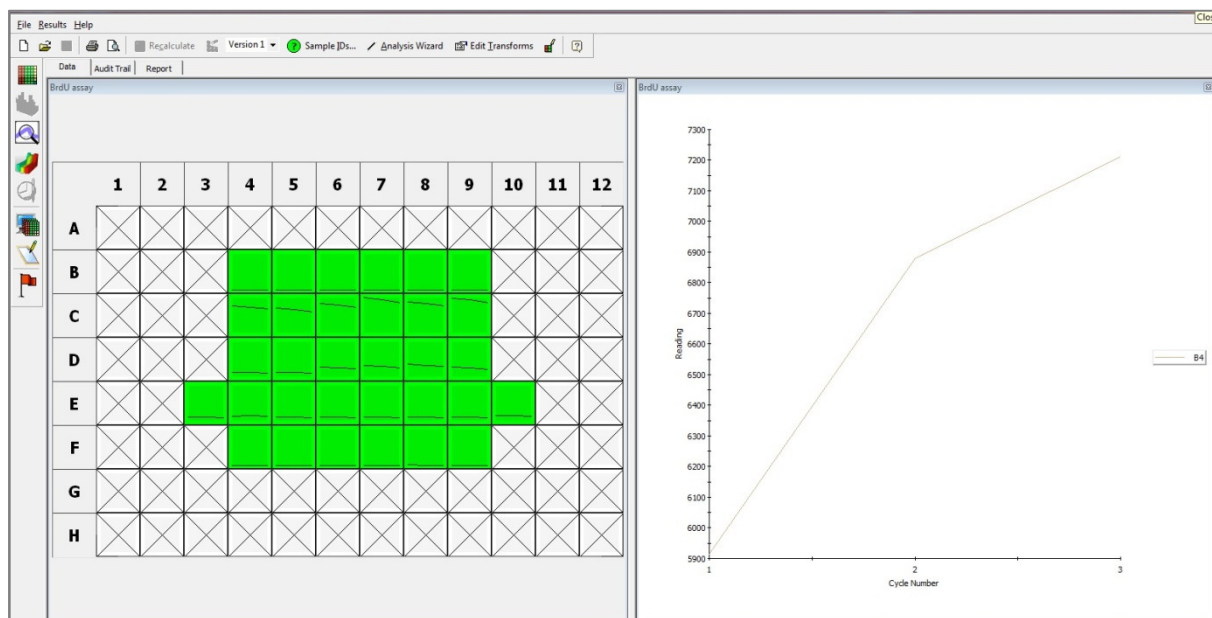


Slika 20. Stanični uzorci korišteni za ispitivanje inhibicije proliferacije limfocita u prisustvu MMS darivatelja D12. (A – PK-MNS/PHA, B – PK-MNS/PHA+MMS, C – PK-MNS, D – MMS/PHA). Povećanje 10x.

Broj klastera limfocita koji nastaju kao odgovor na aktivaciju s mitogenom PHA (Slika 20A) vidljivo je manji u prisustvu MMS (Slika 20B). Kao negativne kontrole korišteni su uzorci

PK-MNS bez dodatka PHA (Slika 20C) i ozračene MMS koje su uzgajane u prisustvu PHA (Slika 20D). Neaktivirani limfociti nisu proliferirali ili je njihova spontana proliferacija bila vrlo slabo izražena. Spontana proliferacija nije uočena niti kod ozračenih MMS uzgajanih u prisustvu PHA. Naime, ozračene MMS su nakon nasada u visokoj koncentraciji (312000 st/cm<sup>2</sup>) adherirale za dno jažice i prekrile njezinu površinu, no zbog oštećenja nastalog kao posljedica ozračivanja nisu bile sposobne proliferirati čak ni uz prisustvo PHA što potvrđuje da je kemiluminiscencijski signal izmjeren u ispitivanim staničnim uzorcima odraz isključivo proliferacije limfocita u odgovoru na mitogen.

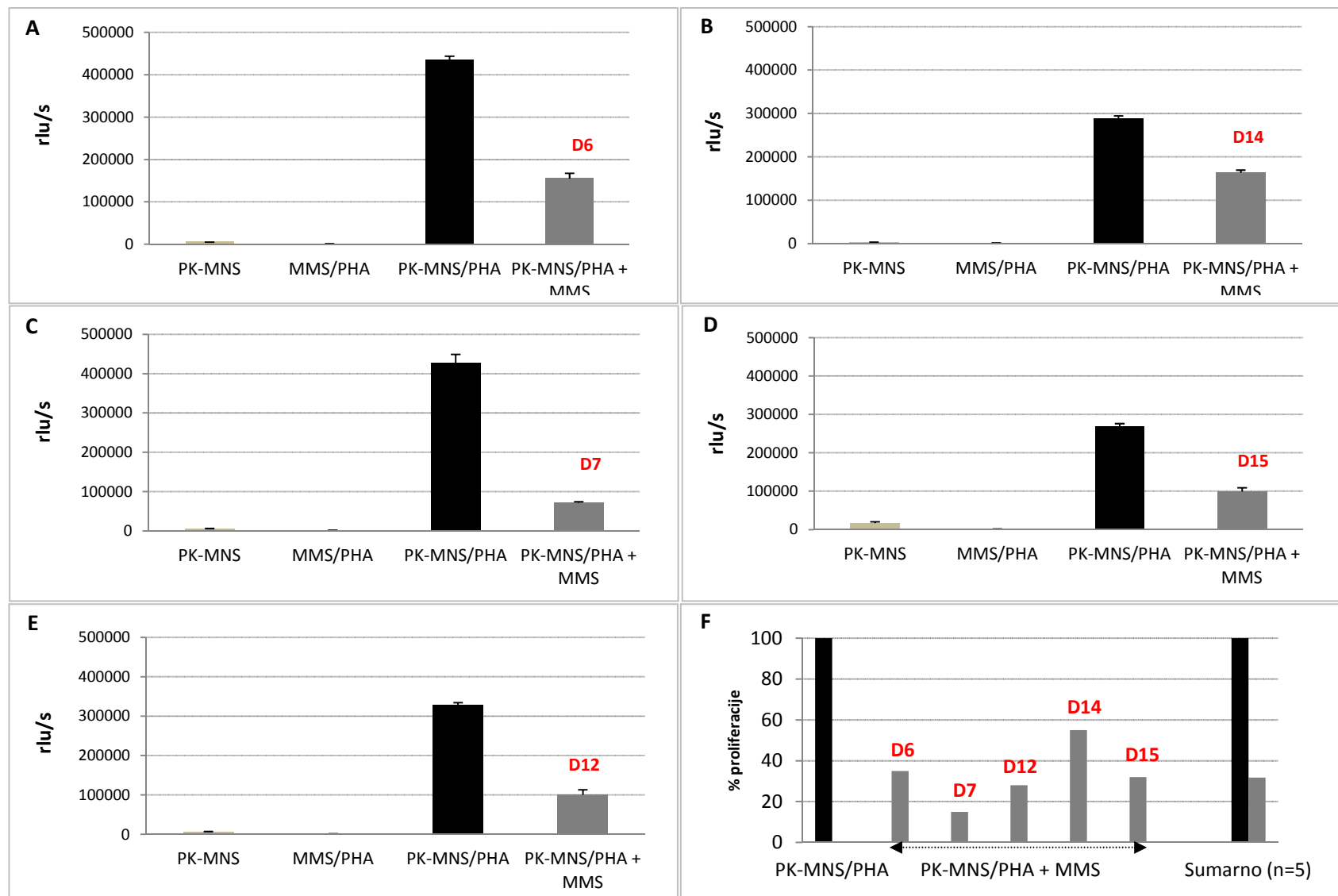
Stanična proliferacija je kvantificirana kemiluminiscencijskim imunotestom te izražena u relativnim svjetlosnim jedinicama po sekundi (rlu/s) pomoću računalnih programa WorkOut 2.5 (PerkinElmer, SAD) i PerkinElmer 2030, v.4.00 (PerkinElmer, SAD) (Slika 21).



Slika 21. Primjer prikaza rezultata kemiluminiscencijskog imunotesta u računalnom programu WorkOut 2.5 tijekom ispitivanja imunomodulatornih svojstava MMS darivatelja D7. Na lijevoj strani je vidljiv grafički prikaz mikrotitarske pločice sa serijama ispitivanih staničnih uzoraka (red B – PK-MNS; red C - PK-MNS/PHA; redovi D i E – PK-MNS/PHA+MMS; red F – MMS/PHA). Visina crtice u pojedinom polju grafički odražava stupanj stanične proliferacije. Numeričke vrijednosti rlu/s preuzimaju se iz programa PerkinElmer2030, v.4.00.

Prosječni stupanj proliferacije staničnih uzoraka pojedinog darivatelja izražen u rlu/s prikazan je na Slikama 22A do 22E iz kojih je vidljivo da je dodatak MMS svakog od ispitivanih darivatelja uzrokovao smanjenje proliferacije mitogenom aktiviranih limfocita.

Slika 22F prikazuje prosječni stupanj proliferacije mitogenom aktiviranih limfocita u prisustvu MMS pojedinih darivatelja u odnosu na 100% proliferacije pozitivne kontrole (PK-MNS/PHA). Uzimajući u obzir rezultate svih darivatelja (n=5), stupanj proliferacije mitogenom aktiviranih limfocita u prisustvu MMS prosječno je iznosio  $33,1\% \pm 14,65\%$  u odnosu na 100% proliferacije pozitivne kontrole (PK-MNS/PHA), a navedena je razlika u stupnju proliferacije bila statistički značajna ( $p=0,002$ ). Dakle, alogene MMS su dodatkom u kulturu mitogenom aktiviranih limfocita inhibirale njihovu proliferaciju za prosječno  $66,9\% \pm 14,65\%$ .



Slika 22. Djelovanje MMS na proliferaciju mitogenom aktiviranih PK-MNS (A, B, C, D, E – utjecaj dodatka MMS pojedinih darivatelja (D) na proliferaciju PK-MNS/PHA u odnosu na uzgojni uvjet bez dodatka MMS. Prikazane vrijednosti rlu/s predstavljaju aritmetičku sredinu ispitanih uzoraka  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine (SE); F- prosječni stupanj proliferacije (%) PK-MNS/PHA u prisustvu MMS pojedinih darivatelja, te sumarno svih darivatelja (n=5) u odnosu na pozitivnu kontrolu (PK-MNS/PHA).

## 6. RASPRAVA

Zbog svojih jedinstvenih imunoloških svojstava i potencijala za regeneraciju tkiva, MMS su već više od dvadeset godina u središtu znanstvene pozornosti. Sigurnost njihove primjene kod ljudi potvrđena je nizom kliničkih ispitivanja, u kojima su autologni i alogeni pripravci ovih stanica primijenjeni bez izazivanja neželjenih pojava. Do sada je terapijski učinak MMS dokazan za niz indikacija, prvenstveno iz područja imunologije, hematologije i regenerativne medicine.

Budući da izravnom izolacijom iz tkiva nije moguće dobiti dovoljan broj MMS za izazivanje terapijskog učinka kod primatelja, klinička primjena MMS podrazumijeva njihovo prethodno umnažanje u kulturi *in vitro*. Interpretacija i usporedba rezultata brojnih do sada objavljenih studija značajno je otežana nepostojanjem standardiziranog protokola za njihovo umnažanje *in vitro*. Protokoli različitih istraživačkih i kliničkih skupina razlikuju se u pogledu tkivnih izvora MMS i metoda njihove izolacije, te uzgojnih uvjeta *in vitro*. Uzevši u obzir da sastav medija u kulturi *in vitro* može značajno utjecati na značajke umnoženih stanica, on se smatra jednim od ključnih čimbenika za uspješan uzgoj stanica (109, 128, 129). Idealan medij za uzgoj stanica *in vitro* trebao bi uspješno poticati staničnu proliferaciju, imati točno definiran kemijski sastav, te biti bez dodatka seruma i antigena životinjskog podrijetla (115). Ovako standardizirani sastav medija bio bi prikladan za farmaceutsku proizvodnju te bi njegova primjena osigurala usporedivost rezultata kako eksperimentalnih, tako i kliničkih studija. Budući da uzgojni medij koji bi ispunjavao sve navedene zahtjeve još nije proizveden, većina kliničkih protokola za umnažanje MMS i dalje se temelji na primjeni medija obogaćenog s FBS-om. Dugi je niz godina poznato da se primatelji staničnih pripravaka umnoženih u prisustvu FBS-a mogu imunizirati na proteine koji su u njemu sadržani. Kod imuniziranih primatelja uočen je izostanak kliničkog poboljšanja nakon terapije s MMS koji je pripisan upravo navedenom sistemskom imunološkom odgovoru (92, 113). Dodatne spoznaje o etički neprihvatljivim metodama proizvodnje FBS-a i nekonzistentnostima u njegovu sastavu, kao i mogućnost prijenosa uzročnika bolesti putem ovog sastojka dovela su do potrage za alternativnim dodacima uzgojnom mediju. Sastojci kojima se obogaćuje medij za uzgoj stanica za kliničku primjenu morali bi biti proizvedeni u skladu s dobrom proizvođačkom praksom (*engl. good manufacturing practice, GMP*) i odgovarajućim regulatornim zahtjevima te učinkovito poticati staničnu proliferaciju.



Smjernice Europske agencije za lijekove koje se odnose na proizvodnju staničnih pripravaka namijenjenih za primjenu kod ljudi nalažu da se svaka promjena u proizvodnom procesu pripravka ispita validacijskom studijom (130). U slučaju uvođenja novog dodatka mediju, potrebno je dokazati da su biološke značajke stanica tijekom uzgoja u mediju promijenjenog sastava, usporedive ili superiorne onima koje su stanice ispoljavale prije uvedene promjene. Kao moguća alternativa FBS-u osobito su se nametnuli proizvodi dobiveni iz ljudske krvi, poput ljudskog seruma, plazme i derivata trombocita. Krvni pripravci udovoljavaju strogim zakonskim zahtjevima za proizvodnju pripravaka za ljudsku primjenu te stoga predstavljaju izvrstan početni materijal za izolaciju dodatka mediju za uzgoj stanica *in vitro*. Do sada su najbolji rezultati postignuti uzgojem MMS u prisustvu derivata trombocita, no zbog izostanka standardiziranog protokola za njihovu proizvodnju, usporedivost rezultata eksperimentalnih i kliničkih studija u kojima su oni korišteni je upitna (131).

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj LT na svojstva MMS tijekom uzgoja u kulturi *in vitro*, te ih usporediti sa značajkama stanica uzgajanih u prisustvu tradicionalno korištenog FBS-a. Ispitivane su biološke značajke ljudskih MMS izoliranih iz KS zdravih darivatelja. Kada je to bilo moguće, MMS su umnažane *in vitro* u tri uzgojna uvjeta (10% LT, 5% LT i 10% FBS), a broj ciklusa presađivanja (*p*) stanica pojedinog darivatelja ovisio je o kinetici rasta i raspoloživom broju stanica. Kod pojedinih darivatelja broj MMS nije bio dovoljan za umnažanje stanica u sva tri uzgojna uvjeta. Razlog tome bili su ograničavajući čimbenici poput malog volumena početnog uzorka KS ili slabe kinetike staničnog rasta koja je bila određena biološkim karakteristikama darivatelja. U navedenim slučajevima uzgoj stanica je nastavljen samo u prisustvu LT, budući da je cilj rada bio istražiti biološke osobitosti MMS umnoženih upravo u ovom uzgojnom uvjetu. Stoga su stanice u navedenim okolnostima uzgajane u prisustvu 10% LT, a kada je bilo moguće i u prisustvu 5% LT, kako bi broj umnoženih stanica bio dovoljan za provođenje svih planiranih testova.

Stanice umnažane u sva tri uzgojna uvjeta adherirale su za plastičnu podlogu kultivacijske posude i izražavale ostale morfološke značajke MMS, poput specifičnog vretenastog oblika stanice nalik fibroblastima s velikom ovalnom staničnom jezgrom. Utjecaj sastava uzgojnog medija na morfologiju stanica nije uočen. Na samom početku uzgoja, stanice su prolazile kroz početnu lag fazu rasta karakteriziranu sporijim umnažanjem, a potom je uslijedila eksponencijalna faza s brzim porastom u kinetici rasta i broju stanica. Populacija MMS nakon početnog nasada u kulturu nije bila u potpunosti homogena te se mikroskopiranjem mogao uočiti i manji broj drugih vrsta stanica sa svojstvom prijanjanja za plastičnu podlogu,

prvenstveno makrofaga. Budući da su stanice makrofaga bile manje, te okruglog oblika bilo ih je lako uočiti u kulturi MMS *in vitro*. Međutim, već nakon p1 kontaminirajuće krvotvorne stanice više nisu bile vidljive u staničnom uzorku, a homogenost populacije MMS dokazana je i protočnocitometrijskom analizom. Navedena analiza je pokazala da MMS umnažane u sva tri uzgojna uvjeta ispoljavaju specifični imunofenotip koji je prema smjernicama Međunarodnog društva za staničnu terapiju jedan od minimalnih kriterija za identifikaciju MMS (32). U p2  $\geq 96\%$  stanične populacije je izražavalo antigene CD73, CD90 i CD105, dok je istovremeno izražaj antigena stanica krvotvornog sustava (CD45-, CD34-, HLA-DR-, CD14-, CD19-) bio  $\leq 2\%$ . Navedeni rezultati pokazuju da umnažanje MMS u prisustvu LT omogućuje dobivanje homogene stanične populacije već u drugom ciklusu presađivanja, što je vrlo važna spoznaja u slučaju kliničke primjene ovih stanica. Von Bahr i suradnici su kod 31 bolesnika oboljelih od GvHD-a i hemoragijskog cistitisa primijenili terapiju s MMS, te dugoročnim praćenjem utvrdili značajno bolji ishod kod onih bolesnika koji su primili MMS iz ranijih ciklusa presađivanja (132).

Tijekom uzgoja u kulturi *in vitro* MMS su nasadiwane u niskoj koncentraciji (1000 MMS/cm<sup>2</sup>) i umnažane do postizanja subkonfluentnosti, odnosno do trenutka kada su stanice prekrile približno 80% podloge kultivacijske posude. Niska koncentracija nasada i umnažanje do stadija subkonfluentnosti pogoduju boljem umnažanju MMS *in vitro* jer smanjuju kontaktnu inhibiciju među stanicama koja je regulirana wnt signalnim putem (133, 134). Svojstvo kontaktne inhibicije također onemogućuje rast MMS u više slojeva, pa se u slučaju prekrivanja čitave raspoložive površine za rast, stanice u sloju odvajaju od plastične podloge nakon čega pojedinačne stanice više nije moguće prikupiti u suspenziji postupkom tripsinizacije. Ren i suradnici su umnažanjem stanica do različitih stupnjeva konfluentnosti pokazali da su pri 100%-tnoj konfluentnosti klonogena sposobnost i proliferacija MMS značajno manje, a vrijeme potrebno za udvostručenje stanične populacije značajno veće nego tijekom uzgoja stanica do 50%, odnosno 80% konfluentnosti (135). Drugim riječima, uzgoj MMS je nakon postizanja subkonfluentnosti neophodno prekinuti, jer u suprotnom, uzgojni uvjeti postaju suboptimalni te se brzina staničnog umnažanja značajno smanjuje, a sukladno tome vrijeme potrebno za udvostručenje stanične populacije značajno raste. Stoga je održavanje subkonfluentne kulture MMS jedan od važnih čimbenika na koji treba obratiti pozornost tijekom uzgoja u kulturi *in vitro* kako bi se očuvale biološke značajke stanica i smanjio gubitak stanica između pojedinih ciklusa presađivanja.

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je utvrditi povezanost kinetike rasta MMS umnoženih *in vitro* s karakteristikama darivatelja KS. Kinetika rasta MMS umnoženih *in vitro* pratila se određivanjem kumulativnog udvostručenja stanične populacije (CPD) na kraju svakog ciklusa presađivanja u odnosu na početak uzgoja, te određivanjem prosječnog vremena potrebnog za jedno udvostručenje stanične populacije (PDT). U istraživanju su ispitane značajke 15 darivatelja MMS; 9 muškaraca i 6 žena starosti od 8-63 godina (medijan 23). Promatrajući uzgojni uvjet od najvećeg interesa za ovo istraživanje (10% PL) utvrđeno je da su najslabiju kinetiku rasta imale MMS izolirane iz KS dvoje najstarijih darivatelja, žene i muškarca starosti 63, odnosno 53 godina. Ipak, općenito nije utvrđena korelacija između spola i dobi darivatelja MMS i kinetike staničnog rasta, što je u skladu s prethodnim nalazima Lunda i suradnika (136). Međutim, za donošenje konačnog zaključka ispitivanje bi trebalo provesti na većem uzorku darivatelja, budući da su rezultati nekih studija pokazali da proliferacijski kapacitet MMS tijekom uzgoja *in vitro* opada s porastom dobi darivatelja (137). Nasuprot tome, jedno je istraživanje pokazalo kako MMS starijih osoba mogu prevladati ovaj pad u staničnoj proliferaciji i ponovno se aktivirati iz stanja dormantnosti ukoliko se umnažaju u adaptiranom mediju, poput onoga korištenog za uzgoj embrionalnih matičnih stanica (138). Stoga bi daljnja istraživanja mogla pomoći razvoju novih uzgojnih uvjeta koji bi omogućili optimalno umnažanje MMS starijih darivatelja za potrebe kliničke primjene u slučajevima kada je to potrebno.

Za razliku od spola i dobi darivatelja, uzgojni uvjet je bitno utjecao na kinetiku rasta MMS *in vitro*. Tako je rast stanica bio značajno sporiji kada su MMS uzgajane u prisustvu FBS-a u odnosu na oba uzgojna uvjeta s LT. Najveću kinetiku rasta MMS su imale u uzgojnom uvjetu s 10% LT, a razlika u brzini staničnog rasta u odnosu na uzgojni uvjet s FBS-om bila je statistički značajna tijekom čitavog trajanja uzgoja *in vitro* ( $p < 0,009$ ). No, potrebno je istaknuti da je u prva dva ciklusa presađivanja stanična populacija rasla značajno brže čak i kada je medij sadržavao nižu (5%) koncentraciju LT u odnosu na uzgojni uvjet s FBS-om ( $p < 0,04$ ). U prilog snažnijem rastu stanica u prisustvu LT govori i podatak da se populacija MMS tijekom uzgoja *in vitro* udvostručila prosječno svakih 33,8 h (10% LT), odnosno 45,5 h (5% LT), a u prisustvu FBS-a tek svakih 144,5 h. Drugim riječima, MMS su u prisustvu LT brže postizale stadij subkonfluentnosti, ranije su presađivane, a cjelokupno trajanje njihovog uzgoja *in vitro* bilo je kraće u odnosu na stanice istog darivatelja čiji se uzgoj provodio u prisustvu FBS-a. Promatrajući sve ove podatke s gledišta potencijalnog razvoja kliničkog protokola umnažanja MMS *in vitro* s ciljem infuzije stanica hematološkim bolesnicima u

ranom poslijetransplantacijskom razdoblju, očigledno je da oba uzgojna uvjeta s LT omogućuju proizvodnju većeg broja stanica u kraćem vremenskom razdoblju u odnosu na protokole koji se temelje na primjeni FBS-a.

Osim kinetike rasta, u ovom istraživanju je ispitivan i utjecaj LT u uzgojnom mediju na klonogeni potencijal uzgojenih stanica. Naime, nasad MMS u uzgojnu posudu u niskoj koncentraciji rezultira formiranjem zasebnih kolonija nalik fibroblastima koje se tradicionalno nazivaju kolonije CFU-F (139). Budući da svaka kolonija CFU-F nastaje od jedne prekursorske stanice koja je adherirala za plastično dno, ovo se svojstvo MMS naziva klonogenost ili klonogeni potencijal. Iako ne postoje biljezi kojima bi se razlikovale multipotentne i usmjerene kolonije CFU-F, učestalost kolonija CFU-F korelira s učestalošću progenitora u uzorku KS (140). Ovo istraživanje je pokazalo da prisustvo LT u uzgojnom mediju ne povećava klonogeni potencijal MMS tijekom njihova umnažanja *in vitro* u odnosu na uzgoj u prisustvu FBS-a. Naime, iako je u svim ciklusima presađivanja, uz iznimku p1, u prisustvu LT utvrđen veći broj kolonija CFU-F u odnosu na uzgojni uvjet s FBS-om, navedena razlika u broju kolonija općenito nije bila statistički značajna. Nasuprot tome, uočene su velike morfološke razlike između kolonija CFU-F naraslih u različitim uzgojnim uvjetima. Naime, kolonije CFU-F narasle u prisustvu LT-a su tijekom svih ciklusa presađivanja bile izrazito velike, te intenzivno obojane nakon djelovanja Mayerove hemalauan otopine, što je ukazivalo na velik broj gusto zbijenih stanica unutar pojedine kolonije. Istovremeno, kolonije CFU-F koje su rasle u prisustvu FBS-a bile su vrlo sitne i slabo obojane. Uzevši u obzir sve uočene razlike u broju i morfologiji kolonija CFU-F između uzgojnih uvjeta može se zaključiti da LT ne povećava klonogeni potencijal MMS, već samo pospješuje kinetiku staničnog rasta zbog čega je svaka kolonija CFU-F narasla u prisustvu LT bila sastavljena od većeg broja stanica i stoga uočljivija tijekom makroskopskog brojanja.

Biološko svojstvo koje je jedinstveno MMS jest njihova sposobnost da se u odgovarajućim uvjetima diferenciraju u različite stanice mezenhinskog podrijetla. U ovom je istraživanju u uvjetima *in vitro* uspješno potaknuta diferencijacija MMS u adipocite i osteoblaste u različitim uzgojnim uvjetima. U slučajevima kada zbog ograničenog broja stanica nije bilo moguće ispitati multipotentnost stanica u svim uzgojnim uvjetima, diferencijacija je potaknuta u uzgojnom uvjetu s 10% LT i/ili 5% LT, budući da su navedeni uzgojni uvjeti bili od najvećeg interesa za ovo istraživanje. Usporedbom brojnosti i morfoloških značajki adipocita diferenciranih u različitim uzgojnim uvjetima primjećeno je da su u prisustvu FBS-a adipociti bili prisutni u nešto manjem broju nego tijekom diferencijacije provedene uz dodatak LT. No,

s obzirom da je adipogeneza u prisustvu FBS-a provedena samo kod dva darivatelja MMS, nije moguće zaključiti da li je ovo opažanje uistinu posljedica djelovanja FBS-a ili činjenice da LT inicijalno potiče brži rast MMS što rezultira većim brojem stanica u uzgojnoj posudi te konačno i većim brojem diferenciranih adipocita. Za razliku od utjecaja uzgojnog uvjeta na diferencijacijski proces, kojeg nije bilo moguće sa sigurnošću utvrditi, nedvojbeno su primjećene individualne razlike u diferencijacijskom potencijalu MMS različitih darivatelja. Iako navedene razlike nisu određivane kvantitativnim metodama, bile su očigledne tijekom mikroskopiranja diferenciranih stanica. Naime, brojnost adipocita, veličina njihovih vakuola i broj lipidnih kapljica, kao i brojnost osteoblasta i njihovih mineralnih depozita bitno su se razlikovali među stanicama različitih darivatelja, što ukazuje na to da su multipotentnost i diferencijacijski potencijal MMS određeni individualnim biološkim značajkama svake osobe. Uočene razlike u diferencijacijskom potencijalu MMS nisu pokazale ovisnost o dobi i spolu darivatelja stanica što je u skladu s rezultatima ranijih studija (138).

Budući da MMS imaju veliki potencijal za umnažanje *in vitro*, u kratkom je vremenu iz relativno malog početnog broja stanica tijekom nekoliko ciklusa presađivanja moguće dobiti dovoljnu količinu stanica za kliničku primjenu. Ovo svojstvo MMS otvara mogućnost njihove široke kliničke primjene, no veliki broj staničnih dioba u kratkom vremenskom razdoblju ujedno nosi i opasnost od pojave genomskih promjena u jezgrama umnoženih stanica. Promijenjene stanice mogu postati ishodište nove stanične linije koja može kontaminirati populaciju MMS i predstavljati potencijalnu opasnost za primatelja takvog transformiranog staničnog pripravka (32). Stoga se u slučaju opsežnog umnažanja MMS preporučuje izvršiti analizu njihova kariotipa kako bi se isključila mogućnost transformacije stanica *in vitro*, iako prema smjernicama Međunarodnog društva za staničnu terapiju ovakva analiza nije neophodna za identifikaciju MMS umnoženih *in vitro* (32).

Skлонost MMS spontanoj transformaciji tijekom umnažanja *in vitro* dugi je niz godina predmet rasprava s obzirom da su različita istraživanja dovela do kontradiktornih nalaza. Interpretacija navedenih nalaza još je teža ukoliko se uzme u obzir činjenica da su u navedenim istraživanjima korištene MMS različitog podrijetla, najčešće ljudske (141-144), štakorske (145) i mišje (146). Osim toga, u navedenim su se istraživanjima razlikovali i tkivni izvori MMS, pa su ispitivanja izvršena na MMS izoliranim iz KS (142-144), masnog tkiva (147), amnijske tekućine (141) te krvi iz pupkovine (148). Nadalje, uzgoj stanica provodio se u različitim uzgojnim uvjetima, a promjene su određivane različitim metodama (molekularnom kariotipizacijom, citogenetskom analizom i subtelomernom fluorescencijskom

hibridizacijom *in situ*, određivanjem dužine telomera i aktivnosti telomeraze, analizom mRNA, te analizom genske ekspresije ciljnih gena poput *p53*, *p21*, *p16* i *Myc*) (143, 146, 148). U dvije studije u kojima su proučavane ljudske MMS izolirane iz KS i masnog tkiva utvrđena je pojava malignih transformacija stanica tijekom umnažanja *in vitro* (144, 150), no navedeni rezultati su naknadno povučeni i reinterpretirani nakon što je otkriveno da je kultura MMS bila kontaminirana staničnim linijama ljudskih fibrosarkoma i osteosarkoma (151). S druge strane, rezultati više studija su pokazali da MMS tijekom uzgoja *in vitro* ne iskazuju nikakve genetske nepravilnosti (143) ili su zabilježene promjene bile prolazne i nisu imale maligni karakter (148, 149). Svemu navedenom treba pridodati i činjenicu da su u kliničkim studijama stotine ljudi primile pripravke MMS umnoženih *in vitro*, pri čemu kod niti jednog primatelja nije prijavljena pojava tumora povezana s njihovom primjenom što govori u prilog sigurnosti ove vrste stanične terapije (152). Ipak, važno je naglasiti da je većina spomenutih istraživanja provedena s MMS umnoženima u prisustvu FBS-a (143-145, 147-148, 153) dok je tek nekolicina studija proučavala genetske nestabilnosti MMS tijekom uzgoja u prisustvu LT (142, 149, 154). Zbog navedenog se razloga u ovom radu osobita pozornost obratila upravo na citogenetsku analizu stanica umnoženih u ovom uzgojnom uvjetu. Kako bi se utvrdilo da li su MMS umnažane *in vitro* doživjele neku vrstu transformacije, u pojedinim je ciklusima presađivanja izvršena citogenetska analiza kariotipa njihovih jezgara. Iako je većina ispitivanih jezgara imala uredan kariotip, u stanicama dvaju darivatelja su pronađene promjene u strukturi kromosoma. Navedene kromosomske aberacije su uključivale translokacije t(12,15), t(9,12) i t(9,14), no u jezgri s translokacijom t(9,12) su utvrđene i dodatne kromosomske promjene. Naime, u ovoj je staničnoj jezgri također nedostajao jedan kromosom 12, te su utvrđena dva marker kromosoma nepoznatog podrijetla. Kako je ova promjena utvrđena u samo jednoj od ispitivanih jezgara, nije je bilo moguće analizirati dodatnim analitičkim tehnikama poput fluorescencijske hibridizacije *in situ* (FISH), pa stoga nije jasno da li je riječ o nebalansiranoj translokaciji ili nekoj drugoj vrsti kromosomske aberacije.

Sve opisane kromosomske promjene uočene su u prisustvu LT, no njihova eventualna povezanost s uzgojnim uvjetom morala bi se utvrditi na većem staničnom uzorku. Međutim, dosadašnje spoznaje ne govore u prilog tome da bi prisustvo LT u uzgojnom mediju moglo uzrokovati veću učestalost promjena u strukturi ili broju kromosoma tijekom uzgoja stanica *in vitro* (149). Zanimljivo je da su kod jednog darivatelja (D6) u trećem ciklusu presađivanja pronađene različite vrste kromosomskih promjena u različitim uzgojnim uvjetima (10% LT i

5% LT). Budući da je navedena pojava zabilježena samo kod ovog darivatelja moguće je da on posjeduje biološki predodređenu kromosomsku nestabilnost. Naime, slučajevi u kojima su MMS jednog darivatelja pokazivale ponavljajuće genomske nestabilnosti kada su uzgajane u različitim uzgojnim uvjetima i ranije su opisane u literaturi (149, 153). Pretpostavljeno je da te promjene nisu povezane s uzgojnim uvjetom, već da su barem djelomično određene prirođenim biološkim značajkama samog darivatelja (149). Važno je istaknuti da se uočene kromosomske promjene nisu održale u staničnoj kulturi u sljedećim ciklusima presađivanja. To je u skladu s prethodno objavljenim podacima koji pokazuju da MMS transformirane tijekom uzgoja *in vitro* nemaju selektivnu prednost u staničnoj kulturi i nisu sposobne stvarati onkogene klonove, već stječu oštećenja DNK koja ih uvode u proces senescencije zbog čega ih nije moguće dokazati tijekom daljnjeg uzgoja *in vitro* (141, 148, 149).

U ovom su istraživanju, nadalje, ispitivana i imunomodulatorna svojstva MMS umnoženih *in vitro*. Naime, upravo sposobnost modulacije imunološkog odgovora, te mogućnost njihove transplantacije u HLA-nepodudarnog primatelja čine MMS jednim od najzanimljivijih oblika stanične terapije u posljednjih dvadesetak godina. Kako bi se dokazala imunomodulatorna svojstva MMS umnoženih *in vitro* u ovom istraživanju, ispitivala se njihova sposobnost da suprimiraju proliferaciju ljudskih limfocita potaknutu mitogenom fitohemaglutininom (PHA). Navedeno ispitivanje može se izvoditi variranjem parametara poput izvora MMS (autologne ili alogene), trenutka dodatka MMS u kulturu limfocita (na početku ili nakon određenog broja dana uzgoja limfocita u kulturi), te broja MMS dodanih u kulturu kako bi se pratio učinak njihove doze. Prethodna istraživanja su pokazala da se učinak MMS na proliferaciju limfocita ne mijenja u ovisnosti o tome da li su u kulturu dodane autologne ili alogene MMS, te da dodatak velikog broja MMS (40 000 MMS : 1 PK-MNS) u kulturu limfocita inhibira njihovu proliferaciju (155). Istovremeno, u nekim je eksperimentima dodatak jako malog broja MMS (10 MMS : 1 PK-MNS) rezultirao povećanjem stupnja proliferacije limfocita (155). Budući da nije vjerojatno da tako mali broj MMS može producirati dovoljnu količinu citokina da izazove promjene u proliferaciji limfocita, nužna su dodatna istraživanja za razjašnjenje učinka doze MMS na proliferaciju limfocita u kulturi *in vitro*.

U ovom su istraživanju ispitana svojstva alogenih MMS umnoženih *in vitro* koje su dodavane limfocitima na početku kulture u omjeru 1:1. Za kvantifikaciju rezultata korišten je kemiluminiscencijski imunotest koji predstavlja neradioaktivnu alternativu [<sup>3</sup>H]-timidin testu koji se tradicionalno koristio za označavanje DNK molekula proliferirajućih stanica. Ove dvije metode za kvantificiranje stanične proliferacije imaju usporedivu osjetljivost i dobru

korelaciju rezultata dokazanu na različitim životinjskim i ljudskim staničnim modelima (156). Kako bi se izbjegli negativni aspekti [<sup>3</sup>H]-timidin testa poput primjene radioizotopa i rukovanja toksičnim scintilacijskim otopinama, ispitivanje je izvršeno neradioaktivnim kemiluminiscencijskim imunotestom. Rezultati su pokazali da su MMS svih ispitanih darivatelja posjedovale imunomodulatorna svojstva. Naime, dodatkom alogenih MMS, proliferacija mitogenom aktiviranih limfocita prosječno se smanjila na 33,1% u odnosu na 100% proliferacije u istim uzorcima bez dodatka MMS, te je navedena razlika u stupnju proliferacije bila statistički značajna ( $p=0,002$ ). Drugim riječima, opseg inhibicije mitogenom potaknute proliferacije limfocita u prisustvu alogenih MMS je prosječno iznosio 66,9 % što je u skladu s ranije objavljenim radovima (44). Dobiveni rezultati potvrđuju da MMS umnožene u prisustvu LT imaju sposobnost modulacije imunološkog odgovora koji nastaje kao odgovor na aktivaciju mitogenima. Klinička ispitivanja koja se temelje na primjeni MMS umnoženih u prisustvu LT trebala bi potvrditi da li se imunosupresijska funkcija MMS uočena *in vitro* ispoljava i u okolnostima *in vivo*.

Ovim istraživanjem je omogućen bolji uvid u biološke značajke i kinetiku rasta MMS umnoženih *in vitro* u prisustvu LT. Istraživanje je pokazalo da su biološke značajke MMS tijekom uzgoja u prisustvu LT usporedive s onima koje stanice ispoljavaju u prisustvu FBS-a, dok je kinetika rasta stanica značajno veća nego tijekom uzgoja u prisustvu tog tradicionalno korištenog dodatka uzgojnom mediju. Pritom se treba naglasiti da bi u slučaju kliničke primjene MMS prednost trebalo dati uzgojnom uvjetu s 10% LT koji se, u kontekstu poticanja staničnog rasta, pokazao superiornim u odnosu na uvjet s 5% LT. Dobiveni rezultati potvrđuju da se FBS u mediju za uzgoj MMS *in vitro* može zamijeniti s LT, što bi u slučaju kliničke primjene MMS doprinijelo sigurnosti i kvaliteti staničnih pripravaka. Uzgojni uvjeti opisani u ovom istraživanju predstavljaju osnovu za razvoj kliničkog protokola umnažanja MMS budući da omogućuju dobivanje dovoljno velikog broja stanica s očuvanim biološkim značajkama u relativno kratkom vremenu, a istovremeno osiguravaju siguran stanični pripravak bez prisustva životinjskih antigena. Osim toga, optimizacija uzgojnih uvjeta opisana u ovom istraživanju još je jedan doprinos kontinuiranim naporima za standardizacijom metoda i uvjeta uzgoja MMS *in vitro* i dodatnom napretku u ovom znanstveno-kliničkom području.



## 7. ZAKLJUČCI

1. Spol i dob darivatelja MMS ne utječu na kinetiku staničnog rasta *in vitro*.
2. Kinetika rasta MMS u kulturi *in vitro* korelira s uzgojnim uvjetom.
3. Kumulativno udvostručenje populacije MMS je značajno veće u prisustvu LT u odnosu na uzgojni uvjet s FBS-om.
4. Vrijeme potrebno za udvostručenje stanične populacije tijekom čitavog trajanja uzgoja MMS *in vitro* značajno je kraće u prisustvu 10% LT u odnosu na uzgojni uvjet s 10% FBS.
5. MMS umnožene u prisustvu LT izražavaju specifični imunofenotip svojstven MMS (CD45-, CD34-, HLA-DR-, CD14-, CD19-, CD90+, CD73+, CD105+).
6. Klonogeni potencijal MMS umnoženih u prisustvu LT usporediv je s onim kojeg stanice imaju tijekom uzgoja u prisustvu FBS-a.
7. Kolonije CFU-F koje rastu nakon nasada MMS u prisustvu LT vrlo su velike i sadrže veći broj stanica u odnosu na one koje rastu u prisustvu FBS-a.
8. MMS uzgojene u mediju s LT zadržavaju multipotentnost te se u odgovarajućim uvjetima diferenciraju u adipocite i osteoblaste.
9. Kromosomske promjene utvrđene u MMS tijekom uzgoja u mediju s LT vjerojatno nisu povezane s uzgojnim uvjetom, već postoji mogućnost da su određene prirođenim biološkim značajkama darivatelja.
10. MMS transformirane tijekom uzgoja u mediju s LT nemaju selektivnu prednost u staničnoj kulturi te se ne održavaju tijekom daljnjeg uzgoja *in vitro*.
11. Uzgojem u mediju s 10% LT, MMS zadržavaju svoja imunomodulatorna svojstva te značajno suprimiraju proliferaciju limfocita potaknutu mitogenom.

## 8. SAŽETAK

Mezenhimske matične stanice (MMS) su nekrvotvorne multipotentne stanice koje imaju svojstvo samoobnavljanja i sposobnost diferencijacije u tkiva mezenhinskog podrijetla. Zahvaljujući svojim imunomodulatornim svojstvima, imunoprivilegiranosti te parakrinom djelovanju, MMS su do danas najviše korištene u liječenju hematoloških stanja i raznih poremećaja imunološkog sustava. Klinička primjena MMS zahtijeva njihovo prethodno umnažanje u kulturi *in vitro*. Protokoli različitih istraživačkih i kliničkih skupina razlikuju se u pogledu tkivnih izvora i metoda izolacije MMS, te uzgojnih uvjeta *in vitro*, što otežava interpretaciju i usporedbu rezultata.

Cilj rada bio je istražiti utjecaj lizata trombocita (LT) na biološke značajke MMS tijekom uzgoja *in vitro*, te ih usporediti sa značajkama stanica uzgajanih u prisustvu tradicionalno korištenog fetalnog goveđeg seruma (FBS) čija primjena u staničnim pripravcima predstavlja opasnost prijenosa uzročnika bolesti i imunizacije primatelja.

Rezultati su pokazali da stanice uzgajane u prisustvu LT i FBS ispoljavaju imunofenotip karakterističan za MMS te imaju usporediv klonogeni potencijal i diferencijacijski kapacitet. Istovremeno, kinetika rasta MMS je značajno veća u prisutvu LT, što se očituje u većem broju udvostručenja stanične populacije u kraćem vremenu. Koncentracija LT u uzgojnom mediju također je utjecala na kinetiku rasta te je rast stanica u svim ciklusima presađivanja bio statistički značajno bolji u mediju s 10% LT u odnosu na uvjet s 5% LT. Stanice umnožene u prisustvu 10% LT zadržavaju imunomodulatorna svojstva te inhibiraju proliferaciju mitogenom aktiviranih limfocita za prosječno 66,9%. Stanice kod kojih su utvrđene kromosomske promjene tijekom uzgoja u mediju s LT nisu imale selektivnu prednost i nisu se održale u kulturi.

Zaključno, ovo istraživanje potvrđuje da bi zamjena FBS-a s LT u mediju za uzgoj MMS *in vitro* omogućila dobivanje klinički značajnog broja MMS u kraćem vremenu uz istovremeno očuvanje svih funkcijskih značajki stanica. Istovremeno, ovo istraživanje čini osnovu za razvoj kliničkog protokola umnažanja MMS u mediju s LT čime bi se doprinijelo sigurnosti i kvaliteti staničnih pripravaka. Optimizacija uzgojnih uvjeta opisana u ovom istraživanju dodatni je doprinos standardizaciji metoda i uvjeta uzgoja MMS *in vitro* i napretku u ovom znanstveno-kliničkom području.

## 9. SUMMARY

### **Biological properties of mesenchymal stem cells expanded *in vitro* in medium with human platelet lysate**

**Marijana Škifić**

**2019**

Mesenchymal stem cells (MSC) are nonhematopoietic multipotent cells that can differentiate into tissues of mesodermal origin. Due to their ability to induce immunological tolerance in the recipient, MSC have been utilized in the treatment of various hematological and immune- and inflammation-mediated diseases. The clinical application of MSC implies prior *in vitro* expansion that usually includes use of fetal bovine serum (FBS) which is associated with a risk of transmitting infectious agents and immunizing events. Furthermore, the varied tissue sources, methodologies of cell preparations and culture conditions used by different MSC research and clinical groups resulted in ambiguities and inconsistencies in this field.

Aim of this study was to evaluate the effect of platelet lysate (PL) on biological properties of MSC expanded *in vitro* in comparison to the FBS culture condition.

The results showed that the cells cultured in different conditions had comparable immunophenotype, clonogenic potential and differentiation capacity. However, MSC growth was significantly enhanced in the presence of PL, which was demonstrated by higher number of cumulative population doublings (CPDs) and shorter population doubling time (PDT). Furthermore, MSCs cultured in the presence of PL were able to cause a 66.9% reduction of mitogen-induced lymphocyte proliferation. Chromosome aberrations observed in the PL condition were transient and did not have selective advantage in the culture system.

In conclusion, this research confirmed that substitution of FBS in the MSC expansion media with PL would enable the yield of clinically relevant numbers of MSC within shorter time period and improve safety and quality of the cell products.

## 10. LITERATURA

1. Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res.* 2005;306:330-5.
2. da Silva Meirelles L, Sand TT, Harman RJ, Lennon DP, Caplan AI. MSC frequency correlates with blood vessel density in equine adipose tissue. *Tissue Eng Part A.* 2009;15:221-9.
3. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood.* 2003;101:2999-3001.
4. Cohnheim J. Über Entzündung und Eiterung. *J Arch Path Anat Physiol Klin Med.* 1867;40:1-79.
5. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974;17:331-40.
6. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966;16:381-90.
7. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6:230-47.
8. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orth Res.* 1991;9:641-50.
9. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M i sur. International Society for Cellular Therapy, Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7:393-5.
10. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC i sur. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-7.
11. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P i sur. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13:4279-95.
12. Tsai CC, Huang TF, Ma HL, Chiang ER, Hung SC. Isolation of mesenchymal stem cells from shoulder rotator cuff: a potential source for muscle and tendon repair. *Cell Transplant.* 2013;22:413-22.
13. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1522-32.

14. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ i sur. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol.* 2001;3:778-84.
15. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003;18:696-704.
16. Caballero M, Pappa AK, Roden KS, Krochmal DJ, van Aalst JA. Osteoinduction of umbilical cord and palate periosteum-derived mesenchymal stem cells on poly(lactic-co-glycolic) acid nanomicrofibers. *Ann Plast Surg.* 2014;72:176-83.
17. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1928-42.
18. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G i sur. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2:477-88.
19. Hegyi B, Sági B, Kovács J i sur. Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall. *Int Immunol.* 2010;22:551-9.
20. Wang HS, Hung SC, Peng ST i sur. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* 2004;22:1330-7.
21. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood.* 2004;103:1669-75.
22. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.* 2004;6:543-53.
23. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C i sur. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood.* 2003;102:1548-9.
24. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod.* 2004;19:1450-6.
25. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 2001;98:2396-402.
26. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA i sur. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica.* 2003;88:845-52.

27. Lai RC, Arslan F, Tan SS i sur. Derivation and characterization of human fetal MSCs: an alternative cell source for large-scale production of cardioprotective microparticles. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:1215-24.
28. Ho AD, Wagner W, Franke W. Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy.* 2008;10:320-30.
29. Mattar P, Bieback K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Front Immunol.* 2015;6:560.
30. Wagner W, Roderburg C, Wein F i sur. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells.* 2007;25:2638-47.
31. Corre J, Barreau C, Cousin B i sur. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *J Cell Physiol.* 2006;208:282-8.
32. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I i sur. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315-7.
33. Jacobs SA, Roobrouck VD, Verfaillie CM, Van Gool SW. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. *Immunol Cell Biol.* 2013;91:32-9.
34. Haddad R, Saldanha-Araujo F. Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: what do we know so far? *Biomed Res Int.* 2014;216806.
35. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V i sur. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci.* 2005;12:47-57.
36. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007;110:3499-506.
37. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M i sur. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99:3838-43.
38. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 2005;105:2821-7.

39. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004;103:4619-21.
40. Chinnadurai R, Copland IB, Patel SR, Galipeau J. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- $\gamma$ -licensed human mesenchymal stromal cells. *J Immunol*. 2014;192:1491-501.
41. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 2009;156:149-60.
42. Nasef A, Mathieu N, Chapel A i sur. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation*. 2007;84:231-7.
43. Selmani Z, Naji A, Gaiffe E i sur. HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2009;87:62-6.
44. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105:1815-22.
45. Yañez R, Oviedo A, Aldea M, Bueren JA, Lamana ML. Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res*. 2010;316:3109-23.
46. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*. 2006;36:2566-73.
47. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E i sur. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107:367-72.
48. Krampera M, Cosmi L, Angeli R i sur.. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:386-98.
49. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006;24:74-85.
50. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006;107:1484-90.
51. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*. 2012;10:709-16.

52. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*. 2013;13:392-402.
53. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010;5:e10088.
54. Najar M, Krayem M, Meuleman N, Bron D, Lagneaux L. Mesenchymal Stromal Cells and Toll-Like Receptor Priming: A Critical Review. *Immune Netw*. 2017;17:89-102.
55. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005;105:2631-9.
56. Trentin JJ. Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal hemopoietic inductive microenvironments (HIM). *Am J Pathol*. 1971;65:621-8.
57. Ellis SL, Nilsson SK. The location and cellular composition of the hemopoietic stem cell niche. *Cytotherapy*. 2012;14:135-43.
58. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19:180-92.
59. Murray IR, West CC, Hardy WR i sur. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71:1353-74.
60. Prockop DJ, Kota DJ, Bazhanov N, Reger RL. Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). *J Cell Mol Med*. 2010;14:2190-9.
61. Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV i sur. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:1142-7.
62. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:10711-6.
63. Assis AC, Carvalho JL, Jacoby BA i sur. Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart. *Cell Transplant*. 2010;19:219-30.
64. Liu N, Tian J, Cheng J, Zhang J. Migration of CXCR4 gene-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the acute injured kidney. *J Cell Biochem*. 2013;114:2677-89.
65. Battiwalla M, Hematti P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2009;11:503-15.



66. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C i sur. Canadian Critical Care Trials Group. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One*. 2012;7:e47559.
67. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*. 1995;16:557-64.
68. Koç ON, Gerson SL, Cooper BW i sur. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2000;18:307-16.
69. Wang LT, Ting CH, Yen ML i sur. Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *J Biomed Sci*. 2016;23:76.
70. Bhansali S, Dutta P, Kumar V i sur. Efficacy of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell and Mononuclear Cell Transplantation in Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized, Placebo-Controlled Comparative Study. *Stem Cells Dev*. 2017;26:471-481.
71. Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H i sur. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*. 2010;59:1662-9.
72. Yang GX, Pan LP, Zhou QY i sur. Therapeutic effects of umbilical cord mesenchymal stem cellstransplantation on systemic lupus erythematosus. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2014;45:338-41, 350.
73. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. 2015;71:181-97.
74. Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, Gambardella S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int J Clin Exp Med*. 2010;3:248-69.
75. Badiavas EV, Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Arch Dermatol*. 2003;139:510-6.
76. Bey E, Prat M, Duhamel P i sur. Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations. *Wound Repair Regen*. 2010;18:50-8.

77. Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS i sur. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol.* 2002;30:870-8.
78. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM i sur. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11:389-98.
79. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B i sur. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 2007;21:1733-8.
80. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H i sur. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood.* 2007;110:2764-7.
81. Sensebé L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* 2010;98:93-107.
82. Kuçi Z, Bönig H, Kreyenberg H i sur. Mesenchymal stromal cells from pooled mononuclear cells of multiple bone marrow donors as rescue therapy in pediatric severe steroid-refractory graft-versus-host disease: a multicenter survey. *Haematologica.* 2016;101:985-94.
83. Ringdén O. Immunotherapy by allogeneic stem cell transplantation. *Adv Cancer Res.* 2007;97:25-60.
84. Paczesny S, Hanauer D, Sun Y, Reddy P. New perspectives on the biology of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:1-11.
85. Maziarz RT. Mesenchymal stromal cells: potential roles in graft-versus-host disease prophylaxis and treatment. *Transfusion.* 2016;56:9S-14S.
86. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B i sur. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004;363:1439-41.
87. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L i sur. Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008;371:1579-86.
88. Kurtzberg J, Prockop S, Teira P i sur. Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (remestemcel-L, Prochymal) as a rescue agent for severe refractory acute graft-versus-host disease in pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:229-35.

89. Auletta JJ, Eid SK, Wuttisarnwattana P i sur. Human mesenchymal stromal cells attenuate graft-versus-host disease and maintain graft-versus-leukemia activity following experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Stem Cells*. 2015;33:601-14.
90. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2007;211:27-35.
91. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA i sur. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. 1999;5:309-13.
92. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK i sur. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:8932-7.
93. Whyte MP, Kurtzberg J, McAlister WH i sur. Marrow cell transplantation for infantile hypophosphatasia. *J Bone Miner Res*. 2003;18:624-36.
94. Soler R, Orozco L, Munar A i sur. Final results of a phase I-II trial using ex vivo expanded autologous Mesenchymal Stromal Cells for the treatment of osteoarthritis of the knee confirming safety and suggesting cartilage regeneration. *Knee*. 2016;23:647-54.
95. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant*. 2016;25:829-48.
96. Uccelli A, Laroni A, Freedman MS. Mesenchymal stem cells as treatment for MS - progress to date. *Mult Scler*. 2013;19:515-9.
97. Llufríu S, Sepúlveda M, Blanco Y i sur. Randomized placebo-controlled phase II trial of autologous mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *PLoS One*. 2014;9:e113936.
98. Ji ST, Kim H, Yun J, Chung JS, Kwon SM. Promising Therapeutic Strategies for Mesenchymal Stem Cell-Based Cardiovascular Regeneration: From Cell Priming to Tissue Engineering. *Stem Cells Int*. 2017;2017:3945403.
99. Hare JM, Traverse JH, Henry TD i sur. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:2277-86.
100. Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY; STARTING collaborators. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells*. 2010;28:1099-106.
101. Pal R, Venkataramana NK, Bansal A i sur. Ex vivo-expanded autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in human spinal cord injury/paraplegia: a pilot clinical study. *Cytotherapy*. 2009;11:897-911.

102. Lataillade JJ, Doucet C, Bey E i sur. New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen Med.* 2007;2:785-94.
103. Benderitter M, Gourmelon P, Bey E i sur. New emerging concepts in the medical management of local radiation injury. *Health Phys.* 2010;98:851-7.
104. Nolta JA, „Next-Generation“ mesenchymal stem or stromal cells for the in vivo delivery of bioactive factors: progressing toward the clinic. *Transfusion* 2016;56:15S-17S.
105. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007;25:2739-49.
106. de Witte SF, Franquesa M, Baan CC, Hoogduijn MJ. Toward Development of iMesenchymal Stem Cells for Immunomodulatory Therapy. *Front Immunol.* 2016;6:648.
107. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med.* 2014;12:260.
108. Rosova I Dao M, Capoccia B, Link D, Nolta JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008;26:2173-82.
109. Menard C, Pacelli L, Bassi G i sur. Clinical-grade mesenchymal stromal cells produced under various good manufacturing practice processes differ in their immunomodulatory properties: standardization of immune quality controls. *Stem Cells Dev.* 2013;22:1789-801.
110. Spees JL, Gregory CA, Singh H i sur. Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther.* 2004;9:747-56.
111. Müller I, Kordowich S, Holzwarth C i sur. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy.* 2006;8:437-44.
112. van der Valk J, Brunner D, De Smet K i sur. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro.* 2010;24:1053-63.
113. Sundin M, Ringdén O, Sundberg B, Nava S, Götherström C, Le Blanc K. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum

- antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*. 2007;92:1208-15.
114. van der Valk J, Mellor D, Brands R i sur. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro*. 2004;18:1-12.
  115. Bieback K, Hecker A, Kocaömer A i sur. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 2009;27:2331-2341.
  116. Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*. 2005;23:1357-66.
  117. Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*. 2007;25:1270-8.
  118. Bieback K, Hecker A, Schlechter T i sur. Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum. *Cytotherapy*. 2012;14:570-83.
  119. Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*. 2007;25:1270-8.
  120. Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 76. 2016;371-387.
  121. Hara Y, Steiner M, Baldini MG. Platelets as a source of growth-promoting factor(s) for tumor cells, *Cancer Res*. 1980;40:1212-6.
  122. Doucet C, Ernou I, Zhang Y i sur. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*. 2005;205:228-36.
  123. Burnouf T, Goubran HA, Seghatchian J. Multifaceted regenerative lives of expired platelets in the second decade of the 21st century. *Transfus Apher Sci*. 2014;51:107-12.
  124. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997;64:295-312.
  125. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999;181:67-73.

126. Pauše Ž. Uvod u matematičku statistiku. Zagreb. Školska knjiga; 1993.
127. Hollander M, Douglas AW. Nonparametric statistical methods. New York. John Wiley and Sons; 1973.
128. Escacena N, Quesada-Hernández E, Capilla-Gonzalez V, Soria B, Hmadcha A. Bottlenecks in the Efficient Use of Advanced Therapy Medicinal Products Based on Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int.* 2015:895714.
129. Pittenger MF, Le Blanc K, Phinney DG, Chan JK. MSCs: Scientific Support for Multiple Therapies. *Stem Cells Int.* 2015:280572.
130. European Medicines Agency (EMA) Committee for Medicinal Product for Human use (CHMP). Guideline on human cell-based medicinal products. 2008 May [pristupljeno 2018 Jan 2]; U: EMA Scientific guidelines. Doc. Ref. EMA/CHMP/410869/2006. Dostupno na:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003894.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003894.pdf).
131. Bernardi M, Agostini F, Chierigato K i sur. The production method affects the efficacy of platelet derivatives to expand mesenchymal stromal cells in vitro. *J Transl Med.* 2017;15:90.
132. von Bahr L, Sundberg B, Lönnies L i sur. Long-term complications, immunologic effects, and role of passage for outcome in mesenchymal stromal cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18:557-64.
133. Samuelsson H, Ringdén O, Lönnies H, Le Blanc K. Optimizing in vitro conditions for immunomodulation and expansion of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2009;11:129-36.
134. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:3213-8.
135. Ren J, Wang H, Tran K i sur. Human bone marrow stromal cell confluence: effects on cell characteristics and methods of assessment. *Cytotherapy.* 2015;17:897-911.
136. Lund TC, Kobs A, Blazar BR, Tolar J. Mesenchymal stromal cells from donors varying widely in age are of equal cellular fitness after in vitro expansion under hypoxic conditions. *Cytotherapy.* 2010;12:971-81.
137. Siegel G, Kluba T, Hermanutz-Klein U, Bieback K, Northoff H, Schäfer R. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med.* 2013;11:146.

138. Dexheimer V, Mueller S, Braatz F, Richter W. Reduced reactivation from dormancy but maintained lineage choice of human mesenchymal stem cells with donor age. *PLoS One*. 2011;6:e22980.
139. Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol*. 1997;97:561-70.
140. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008;2:313-9.
141. Sessarego N, Parodi A, Podestà M i sur. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. *Haematologica*. 2008;93:339-46.
142. Conforti A, Starc N, Biagini S i sur. Resistance to neoplastic transformation of ex-vivo expanded human mesenchymal stromal cells after exposure to supramaximal physical and chemical stress. *Oncotarget*. 2016;7:77416-77429.
143. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F i sur. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res*. 2007;67:9142-9.
144. Røslund GV, Svendsen A, Torsvik A i sur. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res*. 2009;69:5331-9.
145. Foudah D, Redaelli S, Donzelli E i sur. Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chromosome Res*. 2009;17:1025-39.
146. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM i sur. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*. 2006;24:1095-103.
147. Rubio D, Garcia S, Paz MF i sur. Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS One*. 2008;3:e1398.
148. Wang Y, Zhang Z, Chi Y i sur. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death Dis*. 2013;4:e950.
149. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ i sur. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*. 2010;115:1549-53.
150. Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC i sur. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 2005;65:3035-9.

151. Torsvik A, Røslund GV, Svendsen A i sur. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Res.* 2010;70:6393-6.
152. Barkholt L, Flory E, Jekerle V i sur. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies--bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy.* 2013;15:753-9.
153. Borgonovo T, Solarewicz MM, Vaz IM i sur. Emergence of clonal chromosomal alterations during the mesenchymal stromal cell cultivation. *Mol Cytogenet.* 2015;8:94.
154. Centeno CJ, Schultz JR, Cheever M i sur. Safety and complications reporting update on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2011;6:368-78.
155. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol.* 2003;57:11-20.
156. Russmann E et al. *Colloquium Roche Molecular Biochemicals* 4. 1993;4:1-4.



## 11. ŽIVOTOPIS

Marijana Škifić rođena je 03.09.1984. u Zadru, gdje je završila osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje, nakon čega je upisala Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Biološki odsjek, smjer Molekularna biologija. Diplomirala je 2008.g. obranivši diplomski rad pod nazivom „Raznovrsnost haplotipova gena HLA-B27 u hrvatskoj populaciji“ izrađenog u Zavodu za tipizaciju tkivu KBC Zagreb. Od 2008.g. zaposlena je u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, kao molekularni biolog u Hrvatskoj banci tkiva i stanica. Akademске godine 2009/2010 upisala je znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Primila je stipendiju Europske federacije imunoloških društava zahvaljujući kojoj je boravila na tromjesečnoj edukaciji u području kliničke primjene mezenhimskih matičnih stanica u Zavodu za hematologiju i onkologiju Sveučilišne bolnice Johann Wolfgang Goethe u Frankfurtu u Njemačkoj. Dodatnu edukaciju iz područja transplantacije tkiva i stanica stekla je dvomjesečnim tečajem organizacije Transplant Procurement Management Sveučilišta u Barceloni. Dobitnica je nagrade za najbolji poster na Forumu mladih znanstvenika Europske organizacije za molekularnu biologiju 2009.g., te nagrade za najboljeg mladog istraživača na Međunarodnom kongresu Europske udruge tkivnih banaka 2013.g. Autor je i koautor četiri znanstvena rada od kojih su dva publicirana u časopisima indeksiranim u Current Contents-u, dok su dva rada publicirana u međunarodno indeksiranim časopisima.