

Využití destičkového lysátu při kultivacích mezenchymálních kmenových buněk

E. Matějková¹, V. Foltánková², J. Michálek², B. Kubešová¹

¹ Tkáňová banka FN Brno, pracoviště Bohunice, přednostka prim. MUDr. Barbara Kubešová

² Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, Babákův výzkumný institut Lékařské fakulty MU Brno, přednostka prof. MUDr. Roman Hájek, CSc.

Souhrn: Mezenchymální stromální buňky (mesenchymal stromal cells – MSC) jsou heterogenní populací kmenových buněk, které lze izolovat z mnoha různých tkání. MSC mohou diferencovat do buněk mezodermální linie (adipocytů, chondrocytů a osteoblastů) i ostatních zárodečných linií. MSC jsou schopny interagovat s buňkami vrozené i získané imunity, a navozovat tak modulaci některých funkcí imunitního systému. Po *in vivo* podání mohou MSC vyvolat toleranci a migrovat do míst poškozených tkání, kde mohou tlumit vznik prozánětlivých cytokinů a podporovat přežití poškozených buněk. Tato práce shrnuje výsledky experimentů s různými zdroji MSC a dále možnosti jejich izolace a kultivace vzhledem k požadavkům správné klinické praxe (good manufacture practice – GMP).

Klíčová slova: mezenchymální kmenové buňky – destičkový lysát

Use of platelet lysate for mesenchymal stem cell cultivation

Summary: Mesenchymal stem cells (MSCs) are a heterogeneous subset of stromal stem cells that can be isolated from many adult tissues. They can differentiate into cells of the mesodermal lineage, such as adipocytes, osteocytes and chondrocytes, as well as cells of other embryonic lineages. MSCs can interact with cells of both the innate and adaptive immune systems, leading to the modulation of several effector functions. After *in vivo* administration, MSCs induce peripheral tolerance and migrate to injured tissues, where they can inhibit the release of pro-inflammatory cytokines and promote the survival of damaged cells. This article recapitulates experimental data of MSC sources and mechanisms of MSC-isolation and cultivation according to GMP (good manufacture practice) standards.

Key words: mesenchymal stem cells – platelet lysate

Úvod

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) jsou nejvíce zastoupeny v kostní dřeni. Jsou to buňky zodpovědné za regeneraci tkání a byly poprvé popsány Friedensteinem et al v roce 1976 [1–3].

Mimo kostní dřeň jsou MSC lokalizovány i v jiných tkáních lidského těla – např. v pupečnickové i periferní krvi, tukové tkáni, periostu nebo synoviální tekutině.

Hlavními charakteristikami mezenchymálních kmenových buněk je jejich fibroblastoidní morfologie, schopnost vytvářet CFU-F kolonie, schopnost multipotentní diferenciace (do adipocytů, osteoblastů, chondrocytů nebo myoblastů) a charakteristická skladba povrchových znaků CD34⁺/CD45⁺/CD73⁺/CD90⁺/CD105⁺ [4].

MSC jsou v poslední době velmi sledovanou populací, a to pro jejich regenerativní potenciál, který je dle prvních výsledků z klinických studií možné využít

při léčbě širokého spektra onemocnění (ischemie, autoimunitní choroby, reparace tkání a další). S tím je však spojena potřeba kultivace MSC v režimu GMP – ten mimo jiné stanovuje velmi přísná kritéria na kultivační média (bez sérová nebo bez příměsí zvířecích komponent). Požadavky na média a podmínky pro kultivaci buněk s následným použitím v klinické praxi se řídí směrnicí Evropské komise 2001/83/ES.

Vzhledem k tomu, že trh s komerčními médii s GMP certifikátem je v současnosti velmi omezený, bylo nutné nalézt vlastní kompletní médium pro kultivaci MSC pro klinické použití. V naší laboratoři jsme vyzkoušeli médium s 5% destičkovým lysátem. Růst MSC v tomto médiu byl porovnán s růstem MSC v komerčních médiích.

Materiál

V našich experimentech bylo zpracováno celkem 25 vzorků biologického

materiálu – 15krát aspirát kostní dřene (2 ml), 5krát výplach z vaku po separaci kostní dřene a 5krát pupečnicková krev. Veškerý biologický materiál byl odebrán ve FN Brno na základě podepsaného informovaného souhlasu pacienta/dárce.

Metody

Izolace MSC

Pro izolaci MSC byla použita metoda plastické adherence izolovaných mononukleárních buněk.

Biologický materiál byl navrstven na Histopaque (Sigma) v poměru 1 : 2 (Histopaque : materiál) a centrifugován (1 200 ot/40 min/20 °C). Gradientovou centrifugací se vytvořila vrstva mononukleárních buněk. Tato vrstva byla odebrána, promyta Hanksovým roztokem (Sigma) a poté resuspendována v kultivačním médiu a osazena na 75 cm² kultivační lahve (Saerstedt) v koncentraci 1 × 10⁶/cm².

Tab. 1. Přehled výsledků kultivací.

Kultura	Zdroj	Kultivační médium	Absolutní počet MNK (mil.)	Počáteční počet buněk (mil.)	Počet pasáží	Konečný počet buněk (mil.)
MSC08001	PK	MesenCult	221,9	0,310	3	5,079
MSC08002	KD	MesenCult	2,4	0,500	2	4,091
MSC08003	PK	MesenCult	470,4	0	0	0
MSC08004	PK	MesenCult	431,4	0	0	0
MSC08005	PK	MesenCult	686,4	0	0	0
MSC09006	KD	MesenCult	2,0	0	0	0
MSC09007	KD	MesenCult	3,4	0,220	1	0,220
MSC09008	KD	ACF	0,84	0,270	3	4,424
MSC09009	KD	ACF	4,16	0,480	4	15,729
MSC09010	KD	MesenCult	3,2	0,340	6	22,282
MSC09011	KD	MesenCult	1,6	0,018	5	3,589
MSC09012	VV	MesenCult	35	8,600	6	56,361
MSC09013	KD	DMEM + 5%PL	2,2	0,320	6	20,971
MSC09014	VV	MesenCult	120	13,000	6	85,598
MSC09015	VV	MesenCult	45	6,900	6	22,610
MSC09016	KD	DMEM + 5%PL	1,6	0	0	0
MSC09017	KD	DMEM + 5%PL	0,63	0,063	4	1,321
MSC09018	VV	DMEM + 5%PL	90	11,200	6	73,401
MSC09019	KD	DMEM + 5%PL	1,3	1,000	5	32,275
MSC09020	KD	DMEM + 5%PL	1,8	0,840	5	13,763
MSC09021	KD	DMEM + 5%PL	2,0	0,170	4	2,785
MSC09022	KD	DMEM + 5%PL	2,4	3,200	5	20,486
MSC09023	VV	DMEM + 5%PL	32	7,800	6	25,636
MSC09024	KD	DMEM + 5%PL	3,5	0,280	6	15,729
MSC09025	PK	DMEM + 5%PL	617,4	0	0	0

PK – pupečnicková krev, KD – kostní dřev, VV – výplach vaku

Počáteční počet buněk – počet adherentních buněk po 1. pasáži, MesenCult – MesenCult® MSC Basal Medium + 10% Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplement (Human), ACF – bezsérové médium MesenCult®, ACF – Medium (StemCell Technologies), DMEM + 5%PL – Dulbecco's Modified Eagle Medium s GlutaMaxem a D-glukózou + 5% destičkový lyzátní, MNK – mononukleární buňky naizolované z jednotlivých materiálů

Kultivace MSC

Kultivace MSC probíhala ve třech různých médiích, po skončení experimentů byly tyto tři typy kultivací vzájemně porovnány.

Prvním médiem bylo MesenCult® Medium (StemCell Technologies), které se připravuje z MesenCult® MSC Basal Medium a Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplement (Human) v poměru 10 : 1.

Vzhledem k plánované aplikaci MSC pacientům bylo vyzkoušeno také komerční bezsérové médium MesenCult® – ACF Medium (StemCell Technologies).

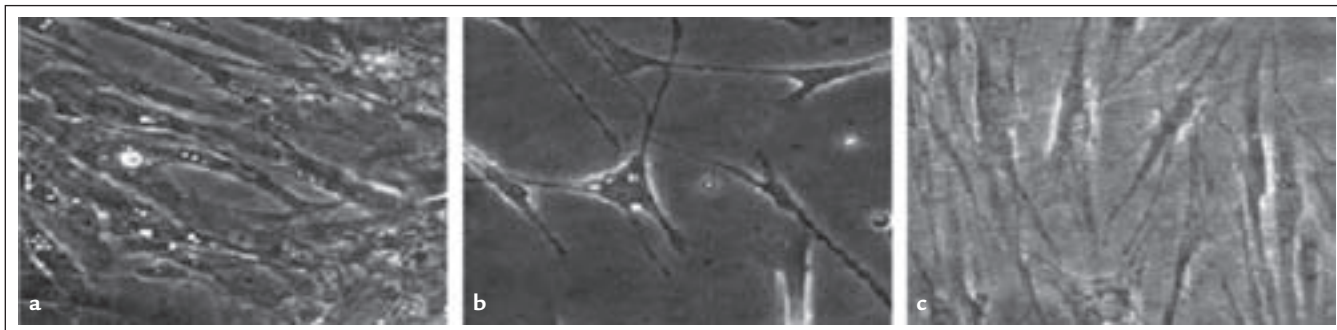
Třetím typem média bylo námi připravené médium s 5% destičkovým lyzátem. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) obohacené GlutaMaxem, D-glukózou a pyruvát (Gibco) bylo smícháno s destičkovým lyzátem (PL) tak, aby finální koncentrace PL byla 5%. Takto připravené médium bylo přefiltrováno přes 0,22µm filtr.

Kultivace MSC probíhala v inkubátoru s 5% CO₂ při 37 °C, médium bylo měněno třikrát týdně. Při dosažení 80–90 % konfluency buněk byly MSC pasážovány.

Flow cytometrická analýza povrchových znaků

U MSC byla pomocí flow cytometrie sledována exprese povrchových znaků na přístroji FACSCanto II (BD Biosciences). Dle doporučení ISCT byly sledovány znaky CD34, CD45, CD73, CD90 a CD105, které charakterizují MSC [4].

Bylo analyzováno vždy minimálně 30 000 událostí. Pro analýzu dat byl použit software BD FACS Diva (BD Biosciences), pro grafickou prezentaci dat byl použit Flow-Jo software (Ashland), verze 7.1.2.



Obr. 1. Morfologie MSC z kostní dřeně (2. pasáž), které byly kultivovány ve třech různých médiích.

(a) MesenCult médium s 10% sérem, (c) bezsérové ACF médium, (c) DMEM + 5% destičkový lyzát. Zvětšeno 100krát.

Výsledky

Kultivace

Komerční médium **MesenCult®** (Stem-Cell Technologies) bylo použito pro kultivaci MSC ze všech vzorků kostní dřeně (z výplachů vaků i aspirátů kostní dřeně) a všech vzorků pupečnickové krve. Kultivace MSC byla provedena dle instrukcí výrobce.

Výsledky kultivace shrnuje tab. 1, morfologii buněk kultivovaných v tomto médiu pak ukazuje obr. 1a.

Na začátku roku 2009 bylo na trh uvedeno **bezsérové médium pro kultivaci MSC – MesenCult ACF Medium (StemCell Technologies)**. Toto médium bylo použito u dvou vzorků kostní dřeně a jako druhý způsob kultivace u tří vzorků kostní dřeně.

Výsledky z těchto kultivací však nebyly uspokojivé – buňky vytvářely CFU-F kolonie až po delším (dvojnásobném) časovém úseku než při kultivaci v médiu MesenCult s 10% séra. Navíc měly buňky sníženou proliferační kapacitu a přecházely do stavu senescence již po třetí, resp. čtvrté pasáži. Proto nebylo toto médium dále používáno. Výsledky kultivace shrnuje tab. 1.

Morfologii buněk z kostní dřeně kultivovaných v tomto médiu ukazuje obr. 1b.

Médium DMEM s 5% destičkovým lyzátem bylo vyvinuto na základě metodiky kultivace MSC týmu Franka Locatelliho v italské Pavii a bylo vybráno na základě splnění požadavků pro GMP standardy.

Poprvé bylo použito pro vzorek MSC z kostní dřeně. Ve srovnání s komerč-

ním médiem MesenCult byly výsledky velmi slibné. Buňky vytvářely CFU-F kolonie již 3.–6. den (medián 4 dny) po zahájení kultivace a dlouhodobě (do 5. pasáže, ± 1 pasáž) si udržovaly vysoký proliferační potenciál. Morfologie MSC se v průběhu kultivace neměnila. Na základě dosažených výsledků bylo toto médium používáno jako první volba ve všech zbylých kultivacích.

Výsledky kultivace shrnuje tab. 1, morfologie buněk kultivovaných v tomto médiu pak ukazuje obr. 1c.

Výsledkem je tedy optimalizovaná a zavedená metodika získávání a kultivace mezenchymálních kmenových buněk v kultivačním médiu použitelném pro další klinické experimenty. Postup kultivace byl zpracován do standardního operačního protokolu (SOP), který se v současné době používá v Univerzitním centru buněčné imunoterapie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity.

Flow cytometrie

Buňky byly izolovány, část z buněk byla odebrána a po inkubaci s monoklonálními protilátkami byla změřena exprese jejich povrchových znaků. Měření bylo opakováno po 2. pasáži. MSC získané ze všech 3 zdrojů neexprimovaly žádné znaky hematopoetických buněk (CD34, CD45) (obr. 2). Všechny analyzované MSC exprimovaly typické markery mezenchymálních stromálních buněk (CD73, CD90 a CD105) (obr. 2). Expresce CD90 a CD105 na MSC z pupečnickové krve byla významně snížena oproti MSC z kostní dřeně.

Výsledkem těchto experimentů je potvrzení, že kultivované mezenchymální

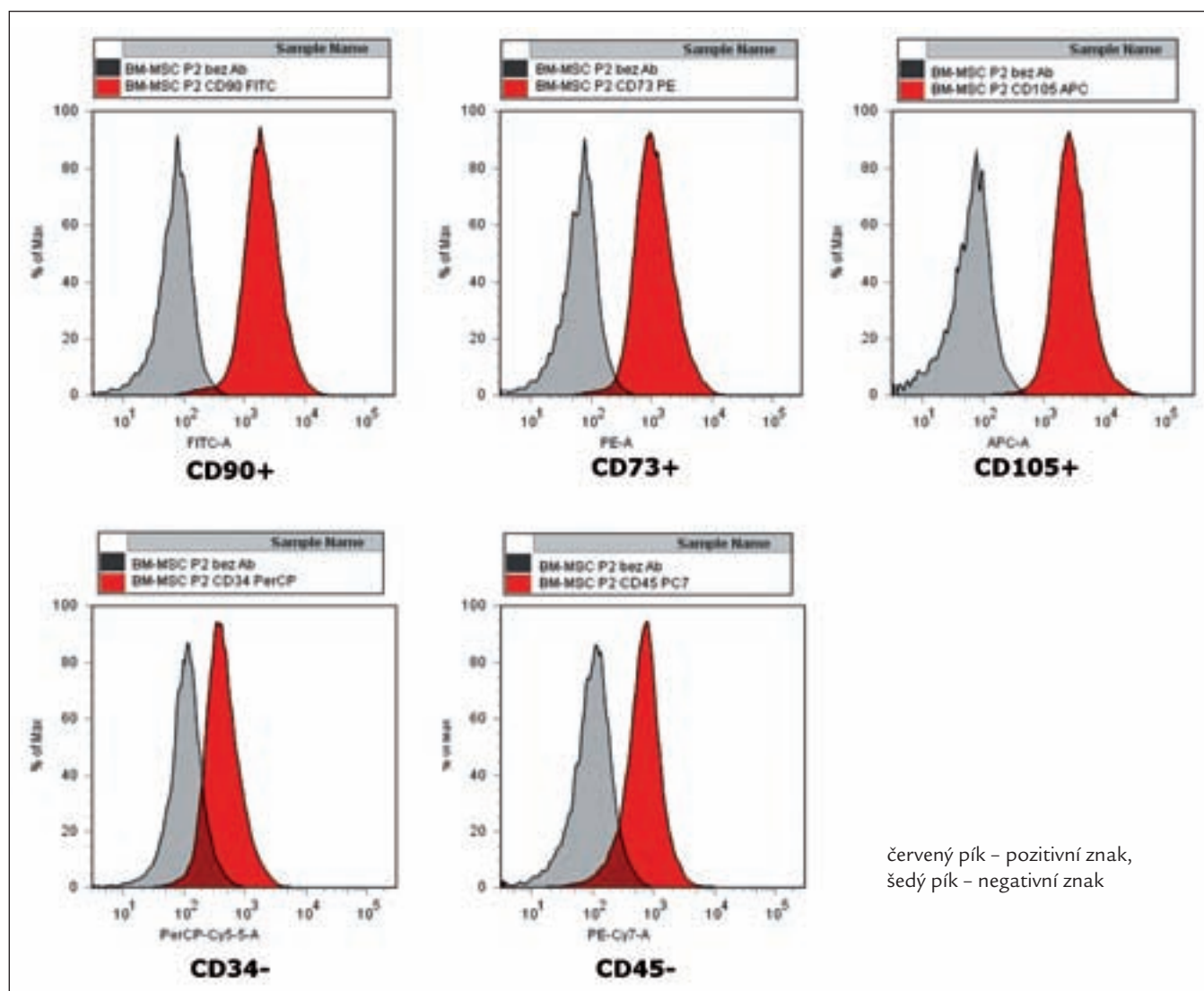
buňky ze všech zkoumaných zdrojů exprimují znaky charakteristické pro MSC (CD73, CD90, CD105) a zároveň neexprimují znaky hematopoetických buněk CD34 a CD45.

Diskuze

Všechny buňky izolované z těchto tří zdrojů měly typické vlastnosti MSC: fibroblastoidní morfologii, adhezenci k plastu, vytváření CFU-F kolonií, schopnost multipotentní diferenciace a expresi charakteristických povrchových proteinů. Markery pro hematopoézu chyběly u všech tří typů MSC, míra exprese CD73 byla u sledovaných buněk shodná. Signifikantní rozdíl byl pozorován u znaků CD90 a CD105. Tyto molekuly jsou asociovány s hematopoézou a migrací buněk, svou úlohu hrají při homingu MSC i ve struktuře stromatu kostní dřeně.

MSC byly izolovány z materiálu od jedinců s různými chorobami (CLL, AML, CMP a další) a různým genetickým zázemím. Variabilita mezi dárci může být těžko sjednocena pro účely izolace MSC, a může tedy významně ovlivnit jejich vlastnosti jako proliferační kapacitu nebo diferenciální schopnost.

Dalším neopominutelným faktem je různý způsob kultivace MSC. Je nutné zohlednit účely, pro které je kultivace MSC prováděna (experimenty, klinické aplikace), a tomu přizpůsobit kultivační protokol. Při klinickém použití MSC je vyvíjen tlak na složení kultivačních médií, kdy je žádoucí používat média bez komponent zvířecího původu (riziko přenosu např. BSE z fetálního bovinního séra). Nejvhodnější



Obr. 2. Reprezentativní flow cytometrická analýza MSC z kostní dřeně.

jsou média bezsérová, avšak námi testované bezsérové médium expanzi MSC příliš nepodporovalo. Bylo proto vyvinuto médium s destičkovým lyzátem, které splňuje nároky na kultivaci MSC pro následné klinické aplikace.

Při kultivacích bylo pozorováno, že významnou roli v udržení proliferace hraje také kontakt mezi buňkami. Pokud byly buňky pasážovány v 70–80% konfluenci, jejich expanzní aktivita byla udržena déle. Jestliže se buňky nechaly dorůst do 100% konfluenci, začala se měnit jejich morfologie a významně se snížila jejich ochota k další proliferaci.

Na základě výsledků našich experimentů můžeme konstatovat, že kostní dřeň a výplachy vaků po separaci kostní dřeně jsou vhodnými zdroji pro izolaci

a následnou expanzi MSC. Pupečnicková krev nebyla vyhodnocena jako vhodný zdroj MSC, a to pro její relativně nízkou proliferativní kapacitu, neúspěšnost kultivací a kontaminaci koloniemi hematopoetických progenitorů. Tato fakta jsou zcela v souladu s literaturou. Kern et al uvádí úspěšnost kultivací MSC z pupečnickové krve 63 %, Wagner et al 34 % a Panepucci et al pouze 29 % [5–7]. Neúspěch při kultivaci MSC z pupečnickové krve připisujeme tomu, že pupečnickovou krev je nutno zpracovat co nejdříve, nejzazší hranice byla stanovena na 4 hod od odběru [5]. Do naší laboratoře se dostaly vzorky pupečnickové krve právě na hranici tohoto limitu.

Kostní dřeň je zatím nepoužívanějším zdrojem MSC pro dosavadní kli-

nické aplikace, např. při experimentální léčbě osteogenesis imperfecta, nemoci štěpu proti hostiteli nebo akutního infarktu myokardu. Bohužel počty, výskyt a diferenciativní kapacita BM-MSC negativně koreluje s věkem – kostní dřeň tedy nemusí být vhodným zdrojem pro izolaci MSC u starších pacientů. V tomto případě však může být zvážena alogenní přístup. Pokud je vyžadován shodný dárce, jeví se jako nejlepší řešení odběr kostní dřeně nebo tukové tkáně od HLA identického sourozence, haplo-identických příbuzných nebo HLA-identických nepříbuzných dárců.

Transplantace a další klinické využití MSC je však v současné době teprve ve fázi časných klinických studií.

Závěr

Závěrem lze tedy konstatovat, že výsledkem experimentů popsaných v této práci je standardní postup kultivace MSC v režimu GMP a ověření stabilního fenotypu kultivovaných MSC z hlediska jejich stálé morfologie a exprese povrchových znaků. Tyto poznatky jsou odrazovým můstkem pro provedení validace procesu izolace a kultivace MSC z kostní dřeně v čistých prostorách Bábákova výzkumného institutu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Poté je plánována klinická studie fáze II, ve které budou autologní MSC podány pacientům s různými autoimunitními chorobami. Tato klinická studie bude dalším rozšířením portfolia Univerzitního centra buněčné imunoterapie v souladu s dlouhodobým zaměřením

tohoto pracoviště a nabídne moderní přístup léčby pro indikované pacienty.

Tato práce byla podpořena grantem MŠMT NPV II 2B06058 a grantem rektora Masarykovy univerzity pro tvůrčí činnost studentů č. MUNI/31/E0021/2008.

Literatura

1. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurole-
sova AI et al. Heterotopic of bone marrow.
Analysis of precursor cells for osteogenic
and hematopoietic tissues. Transplanta-
tion 1968; 6: 230–247.
2. Friedenstein AJ. Precursor cells of mecha-
nocytes. Int Rev Cytol 1976; 47: 327–359.
3. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gera-
simov UV. Bone marrow osteogenic stem
cells: in vitro cultivation and transplanta-
tion in diffusion chambers. Cell Tissue Kinet
1987; 20: 263–272.
4. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M et
al. Clarification of the nomenclature for
MSC: The International Society for Cellular

Therapy position statement. Cytotherapy
2005; 7: 393–395.

5. Kern S, Eichler H, Stoeve J. Comparative
analysis of mesenchymal stem cells from
bone marrow, umbilical cord blood, or adi-
pose tissue. Stem Cells 2006; 5: 1294–1301.

6. Wagner W, Wein F, Seckinger A et al.
Comparative characteristics of mesenchy-
mal stem cells from human bone marrow,
adipose tissue, and umbilical cord blood.
Exp Hematol 2005; 11: 1402–1416.

7. Panepucci RA, Siufi JL, Silva jr. WA.
Comparison of gene expression of umbi-
linal cord vein and bone marrow-derived
mesenchymal stem cells. Stem Cells 2004;
22: 1263–1278.

RNDr. Eva Matějková
www.fnbrno.cz
e-mail: eva.matejkova@fnbrno.cz

Doručeno do redakce: 2. 4. 2010

www.urologickelisty.cz