

Porovnání stromálních buněk kostní dřeně z různých anatomických lokací z hlediska jejich možného klinického využití

Comparison of Bone Marrow Stromal Cells from Different Anatomical Locations for Evaluation of Their Suitability for Potential Clinical Applications

P. NECKAŘ¹, V. HAVLAS², D. LYKOVÁ³, J. BRANIŠ³, J. KVÍZOVÁ³, P. O. BAUER³

¹ Ortopedické oddělení, oddělení sportovní medicíny, Krajská zdravotní a.s., Masarykova nemocnice, Ústí nad Labem

² Klinika dětské a dospělé ortopedie a traumatologie 2. LF UK a FN v Motole, Praha

³ Bioinova, s.r.o., Praha

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

In patients older than 40 years of age, treatment of chondral lesions of the knee employing microfractures does not provide satisfactory outcomes. One of the contributing factors may be the age-related lack of sufficient mesenchymal stromal cells able to efficiently migrate into the desired site of the lesion. Concomitant application of mononuclear cells (MNCs) or cultured mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from bone marrow and seeded on a 3D scaffold could provide an alternative enhancing therapeutic efficacy in these patients. The aim of our study was to assess two different sources of bone marrow for isolation of progenitor cells. To be specific, material obtained from proximal tibia and iliac crest (the commonly used bone marrow source) was compared in terms of quantity and quality of cells and their suitability for cell-based treatment of chondral lesions.

MATERIAL AND METHODS

Bone marrow was collected during a total knee replacement surgery from the iliac crest and the proximal metaphysis of the tibia from ten volunteers older than 40 years of age, using aspiration biopsy needles. The MNCs from the obtained material were isolated, cultured and analyzed for their phenotypic features. Both sources were compared as to the yield and viability of MNCs and MSCs as well as the ability of MSCs of chondrogenic differentiation.

RESULTS

The MNCs concentration/yield was significantly higher in samples from the iliac crests. Similar results were obtained with cultured MSCs after the first passage when the MSCs/MNCs ratio was compared. Nevertheless, the qualitative analysis that included MSCs immuno-phenotyping, viability and population doubling time showed no difference between the two tested bone marrow sources.

DISCUSSION

Particularly in older patients, therapies of chondral defects employing bone marrow-stimulating techniques result in unsatisfactory outcomes. Therefore, orthopedic surgeons have turned their attention to cell-based treatments. Bone marrow located in pelvic bone and metaphysis of long bones (distal femur, proximal tibia) contains mononuclear cells that possess features of MSCs. In accordance with other authors, quantitative differences between the cells from two anatomical locations were found in our cohort of patients. Qualitatively, however, there was no significant variability observed. We also confirmed that the metaphysis of proximal tibia is a suitable source for cultured MSCs. Moreover, in contrast to several reports, the quality of these cells does not appear to decrease with the patients' age.

CONCLUSIONS

The iliac crest represents a superior bone marrow source for the MNCs and MSCs yield when compared with tibia. However, there was no qualitative difference between the isolated and cultured cells. The population doubling time analysis showed that the tibia is a good alternative source of MSCs which can be obtained at therapeutically relevant numbers for example for the treatment of chondral lesions of the knee.

Key words: bone marrow, mesenchymal stem cells, MSC, mononuclear cells, chondral defects, osteoarthritis.

Studie byla financována z interní grantové podpory Krajské zdravotní, a.s. (reg. č. IGA-KZ-2018-1-5).

ÚVOD

Poranění chrupavky úrazem, opakované nadměrné přetěžování kloubů, porucha kongruence kloubního povrchu, nebo volná tělíska v kloubu vedou k poškození kloubního povrchu. Díky avaskulární povaze chrupavky je poškození této tkáně spojeno s nízkou schopností regenerace (16). Nezřídka se tak u starších pacientů po poranění chrupavky rychle rozvíjí osteoartróza (2). Degenerativní proces, který ovlivňuje patofyziologii chrupavky, vede postupně k dalšímu poškozování tkáně, dostávají se změny kvality chrupavky a subchondrální kosti se ztlustěním kalcifikující zóny (5, 16). Výše uvedené procesy vedou ke změně distribuce zatížení povrchu kloubu a rozvoji osteoartrótických změn kolenního kloubu (5).

Jelikož je míra obnovy chrupavky přímo ovlivněna lokálními fyziologickými procesy, je zřejmé, že bez dostatečné *in situ* expozice růstovým faktorům a progenitorovým buňkám v důsledku omezeného cévního zásobení poškozené hyalinní chrupavky nemůže docházet k adekvátní regeneraci poškozené tkáně.

Chirurgická léčba fokálních defektů chrupavky má za cíl obnovu poškozené tkáně, snížení bolesti a prodloužení aktivního života pacienta. Mezi nejčastější chirurgické procedury patří mikrofraktury (28), mozaikoplastika (12), autologní chondrocytární implantace (4) a alogenní transplantace (10). Použití autologních mezenchymálních buněk (MSCs) z kostí dřeně, tuku, nebo synoviální tkáně je stále zkoumáno (1, 18). Typ vhodného operačního výkonu je určen velikostí a hloubkou defektu, spolu s kvalitou okolní tkáně. Operační zákroky stimulující kostní dřev jsou nejrozšířenější a nejlevnější operační technikou. Přesto i u těchto postupů dochází k selhání terapie, a to zejména u pacientů nad 40 let (20). Do popředí zájmu se proto v poslední

době dostává buněčná terapie, přičemž se ukazuje, že autologní a alogenní chondrocytární transplantáty mají dlouhodobější klinický efekt a vytvářejí kvalitnější tkáň podobnou hyalinní chrupavce, nežli dřev-stimulující techniky (11, 14, 23, 24).

Tento fakt nás vedl k vytvoření pracovní hypotézy, že důvodem je buď nízká nabídka, anebo kvalita progenitorových buněk v místě poškozeného kolenního kloubu, která se s věkem pacienta snižuje.

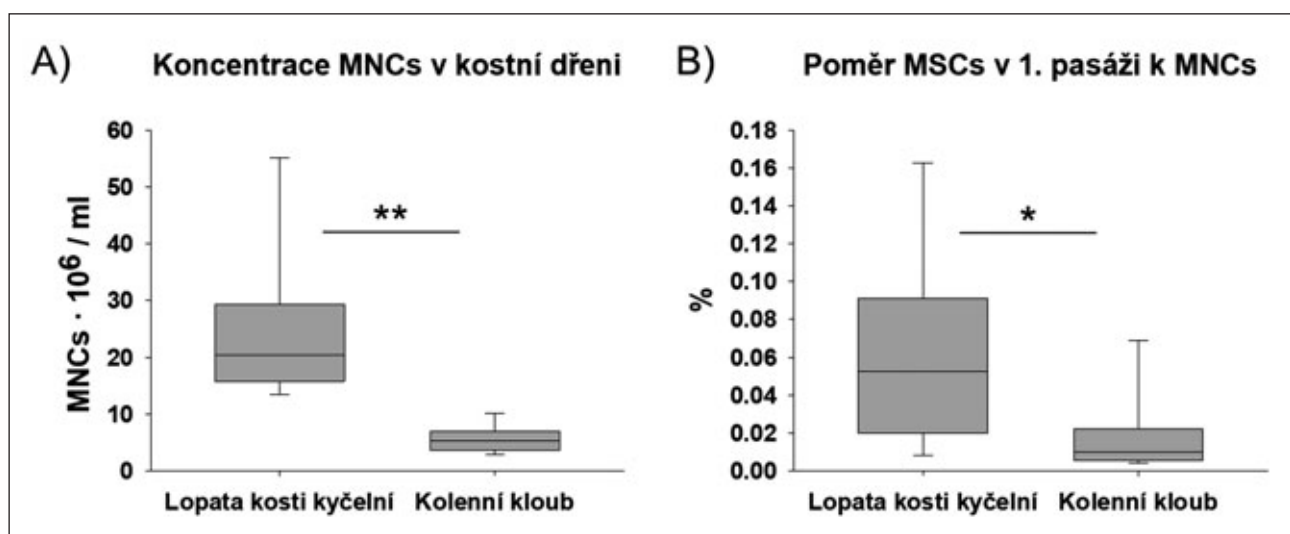
Cílem naší studie bylo charakterizovat alternativní zdroj kostní dřeně, který by poskytoval vhodný materiál pro přípravu buněčného léčivého přípravku a vyzkoumat, zda se u sledovaných pacientů aspirát kostní dřeně z pánevní kosti a proximální tibie liší kvantitou a kvalitou mononukleárních buněk (MNCs) a autologních mezenchymálních buněk (MSCs). Z praktických důvodů by náhrada pánevní kosti, jako nejčastěji využívaného zdroje kostní dřeně vhodným alternativním zdrojem, který by byl technicky dostupnější, anatomicky bezpečnější, a který by pacienta zatěžoval v menší míře, byla velice výhodná.

MATERIÁL A METODIKA

Soubor pacientů

Celkem 10 náhodně vybraných pacientů Ortopedického oddělení Masarykovy nemocnice, o.z., Krajské zdravotní, a.s., podstoupilo po vyslovení informovaného souhlasu s účastí ve studii odběr kostní dřeně z lopaty kyčelní a proximální metafýzy tibie v rámci prováděné plánované totální náhrady kolenního kloubu.

Vstupními kritérii byl věk nad 40 let a osteoartróza kolenního kloubu indikovaná k totální endoprotéze kolenního kloubu. Ze studie byli vyloučeni pacienti



Obr. 1. Výtěžnost buněk. Krabicové grafy zobrazují koncentraci MNCs v aspirátu kostní dřeně z obou odběrových míst (A) a poměr získaných MSCs v 1. pasáži k počtu odebraných MNCs u obou odběrových míst (B). Data jsou zobrazená včetně mediánu ($n=10$; $p=0,001-0,01$ **; $0,01-0,05$ *; chybové úsečky představují kvartily – 5–25 % a 75–95 %).

Fig. 1. Cell yield. The boxplots show the concentration of MNCs in bone marrow aspirate from both harvest sites (A) and the ratio of obtained MSCs in the 1st passage to the amount of harvested MNCs from both the harvest sites (B). The data is given including the median ($n=10$; $p=0.001-0.01$ **; $0.01-0.05$ *; the error bars represent quartiles – 5–25% and 75–95%).

s kostním defektem a výraznými sklerotickými, či posttraumatickými změnami v inzertním bodu proximální tibie na rtg. Vstupní laboratorní hematologické testy krevního obrazu a koagulace byly provedeny maximálně 3 týdny před zákrokem a jejich výsledky musely spadat do populačních norem referenční laboratoře. Vybraní pacienti museli být bez anamnézy příjmu nebo odběru krevních derivátů v posledních 3 měsících před plánovanou trepanobiopsií. Studie byla schválena etickou komisí Krajské zdravotní a.s.

Odběr kostní dřeně

Aspirát kostní dřeně byl od všech pacientů získán trepanobiopsickou jehlou ze dvou inzertních bodů: z anterolaterální hrany lopaty kosti kyčelní a z oblasti proximální metafýzy tibie (interkondylický prostor před místem inserce předního zkříženého vazy) operovaného kolenního kloubu (kloubní náhrada). Trepanobiotická jehla byla v obou případech zavedena do spongiózních částí kosti do hloubky 2-3 cm. Z každého odběrového místa bylo odebráno celkem 13-15 ml aspirátu kostní dřeně do 20 ml stříkaček Omnifix Luer Lock Solo (B. Braun), které obsahovaly 2 ml antikoagulačního roztoku ACD-A (Fresenius Kabi AG). Materiál byl transportován k certifikovanému výrobcí léčivých přípravků moderní terapie, společnosti Bioinova, s.r.o., kde bylo provedeno zpracování kostní dřeně, včetně izolace mononukleárních buněk (MNCs), kultivace a imunofenotypizace mezenchymálních kmenových buněk (MSCs). Buňky z obou zdrojů byly navzájem porovnány z pohledu viability a výtěžnosti MSCs.

Izolace a kultivace MSCs

K odebraným aspirátům byl přidán Gelofusin (B. Braun) pro vytvoření frakce MNCs. Koncentrace MNCs před i po sedimentaci v Gelofusinu byla stanovena pomocí hematologického analyzátoru ABX Micros 60 (HORIBA Medical). Získaná frakce MNCs byla nasazena na kultivační láhev o koncentraci $1,2-1,6 \times 10^5$ MNCs/cm² a kultivována v médiu Alpha MEM (Lonza) s 5% supplemmentem Stemulate (Cook General BioTechnology) a 1% antibiotiky/antimykotiky (Penicilin, Streptomycin, Amfotericin B; Thermo Fisher Scientific) při teplotě 37 °C a v atmosféře obsahující 5% CO₂. Po 24-48 h byly suspenzní buňky odstraněny oplachem PBS (Lonza) a k adhezivním buňkám bylo přidáno čerstvé kultivační médium. Kultivované MSCs byly pasážovány při dosažení 80-90% konfluency v rámci buněčných kolonií za použití TrypLE (Life Technologies) a opět vysety. Počet buněk v 1. i 2. pasáži byl stanoven pomocí přístroje Luna-II Cell Counter (Logos Biosystems).

Průtoková cytometrie

Kultivované MSCs izolované z lopaty kosti kyčelní a kolenního kloubu byly na úrovni 2. pasáže analyzovány na znaky MSCs dle dříve publikovaných parametrů (7) a na viabilitu (13-20 dní kultivace, 80-90% konfluency). Buněčná suspenze byla inkubována s konjugovanými monoklonálními lidskými protilátkami: CD105-PE, CD45-PB, CD14-PB, CD19-PB (Exbio), CD90-APC,

CD73-PerCP/Cy5.5, CD34-PB (Biolegend) a HLA-DR-FITC (Beckman Coulter). Apoptotické a nekrotické buňky byly značeny pomocí propidium jodidu (PI) (Exbio). Samotná analýza, z které byly vyloučeny buňky v dubletu (FSC-A×FSC-H) a buněčná debris (FSC-A×SSC-A), byla provedena průtokovým cytometrem BD FACS Canto II (BD Biosciences). Neznačený vzorek buněčné suspenze byl použit jako negativní kontrola a značené kompenzační kuličky (BD Biosciences) byly použity pro výpočet kompenzační matice. Získaná data od všech 10 dárců byla hodnocena jednotlivě a na závěr sloučena a vyhodnocena pomocí programů FlowJo (Tree Star) a FSC Express (De Novo Software).

Vyhodnocení a statistická analýza

Doba zdvojení populace MSCs (Population doubling time, PDt) byla stanovena mezi 1. a 2. pasáží pomocí rovnice, kde t = doba mezi 1. a 2. pasáží [h], N_0 = počet buněk v 1. pasáži určených pro kultivaci, N = počet buněk v 2. pasáži na konci kultivace. PDt je jedním ze sledovaných parametrů u MSCs v rámci přípravy buněčných léčivých přípravků pro klinické použití. Hodnota PDt je důležitým kvalitativním znakem, který určuje proliferativní schopnost buněk, na jehož základě je možné určit kvalitu (zdraví) buněk, které jsou pacientům aplikovány (15, 29). Obrázky morfologie buněk byly pořízeny pomocí mikroskopu EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific) a upraveny programem ImageJ (National Institutes of Health, USA). Získaná data byla vyhodnocena pomocí programu Sigma-Plot (Systat Software). Jako statistický test byl použit jednostranný t-test. Za statisticky významnou byla považována hodnota hladiny významnosti $p < 0,05$. Vyšší hodnoty nebyly hodnoceny jako statisticky významné (ns, non-significant).

VÝSLEDKY

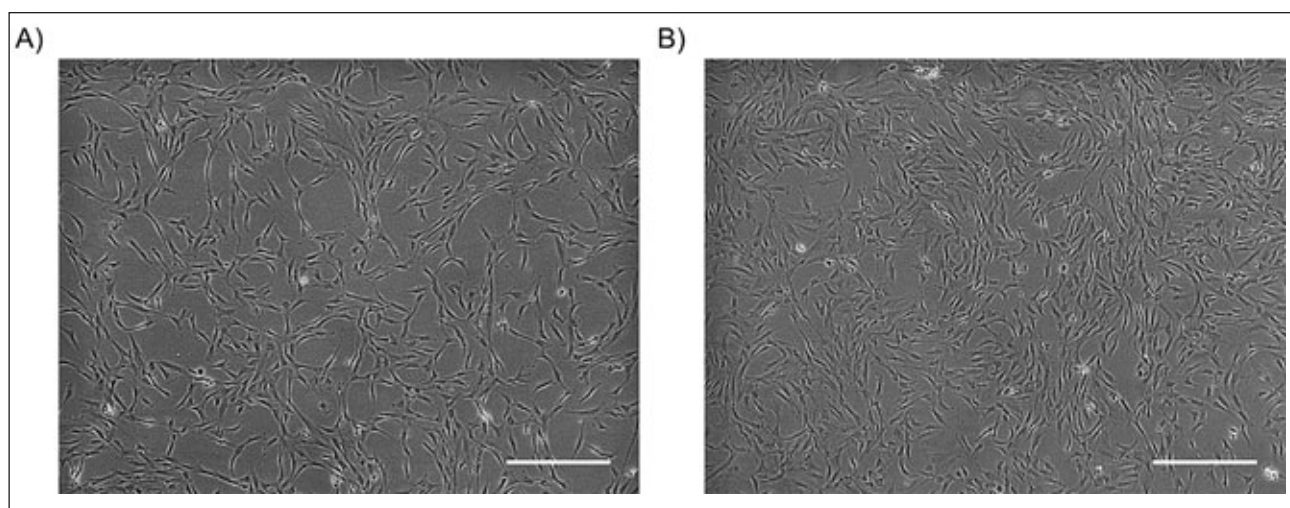
Kvantitativní analýza buněk

Koncentrace MNCs byla signifikantně vyšší u aspirátu kostní dřeně odebraného z lopaty kosti kyčelní. Medián získaných MNCs z kolenního kloubu po sedimentaci byl $5,4 \times 10^6$ MNCs/ml, zatímco u odběru z lopaty kosti kyčelní $20,5 \times 10^6$ MNCs/ml (obr. 1A). Výtěžnost kultivovaných MSCs byla stanovena jako poměr počtu MSCs v 1. pasáži a počtu MNCs, které byly použity pro kultivaci. Měření ukázalo statistickou významnost a větší podíl MSCs k počtu MNCs pocházejících z lopaty kosti kyčelní (5,2 %), zatímco u kolenního kloubu byl podíl pouze 1,0 % (obr. 1B).

Kvalitativní analýza buněk

Kvalitativní analýza zahrnovala imunofenotypizaci, viabilitu, PDt MSCs populace. Morfologie buněk byla u MSCs z obou odběrových míst podobná (obr. 2).

Pro stanovení imunofenotypu kultivovaných MSCs z obou odběrových míst byla data od všech dárců analyzována pomocí průtokové cytometrie na přítomnost specifických povrchových znaků MSCs. Za populaci MSCs byly považovány buňky pozitivní na přítomnost znaků



Obr. 2. Mikroskopický snímek zachycující morfologii buněk MSCs odebraných z lopaty kosti kyčelní (A) a kolenního kloubu (B) od téhož dárce během kultivace mezi 1. a 2. pasáží. Měřítka odpovídá 500 μ m.

Fig. 2. Microscopic image illustrating the morphology of MSCs collected from the iliac crest (A) and knee joint (B) from the same donor during the cultivation between the 1st and 2nd passage. The scale bar is 500 μ m.

CD105, CD90, CD73 a současně nevykazující přítomnost negativních znaků CD45, CD34, CD14, CD19 a HLA-DR. Medián procentuálního zastoupení MSCs v celkové populaci kultivovaných buněk u odběru z lopaty kosti kyčelní byl 97,3 %, v případě odběru z kolenního kloubu 96,8 % (obr. 3A). Naměřená data všech dárců byla sloučena a analyzována na každý specifický povrchový znak odděleně. Populace buněk pocházejících z lopaty kosti kyčelní vykazuje o 0,3 % menší procentuální zastoupení buněk pozitivních na povrchové znaky CD105, CD73 a CD90 v porovnání s buňkami izolovanými z kolenního kloubu. U negativních znaků výsledky ukazují vyšší hodnoty nežádoucích příměsí buňky z lopaty kosti kyčelní a to o 2,3 % u HLA-DR a o 0,7 % u CD14, CD19, CD34 a CD45 (obr. 3B, C). Tyto výsledky však neukazují statisticky významné rozdíly.

Viabilita kultivovaných MSCs byla měřena průtokovou cytometrií bezprostředně po 2. pasáži pomocí značení PI, kdy PI-negativní buňky představují viabilní populaci. V rámci porovnání procentuálního zastoupení viabilních buněk je medián měření 93,5 % v případě buněk lopaty kosti kyčelní a 94,4 % v případě buněk kolenního kloubu. Graf na obrázku 4A znázorňuje různorodost získaných dat jednotlivých dárců. Při sloučení dat od všech dárců představovala viabilní populace 93 % buněk z lopaty kosti kyčelní a 92,7 % buněk z kolenního kloubu (obr. 4B, C). Ani jeden z těchto přístupů nevykazuje statisticky významný rozdíl.

MSCs izolované z kolenního kloubu vykazovaly vysokou variabilitu v PDt oproti buňkám z kyčelní kosti (obr. 5A). Medián hodnot PDt u buněk z kyčelní kosti byl 55,4 h, u buněk z kolenního kloubu pak 68,0 h. Přestože jsou od sebe tyto hodnoty vzdálené, statistický test neprokázal významný rozdíl.

Pro stanovení korelace věku dárce s množstvím MNCs v kostní dřeni nebo korelace kvality MSCs s věkem dárce je počet vzorků pro analýzu nízký a v souboru se vyskytuje mnoho odlehklých hodnot, především u odběru

z kolenního kloubu. Nicméně byla pozorována mírná tendence růstu závislosti PDt na věku dárce u MSCs získaných z lopaty kosti kyčelní a naopak mírný pokles u MSCs z kolenního kloubu (obr. 5B).

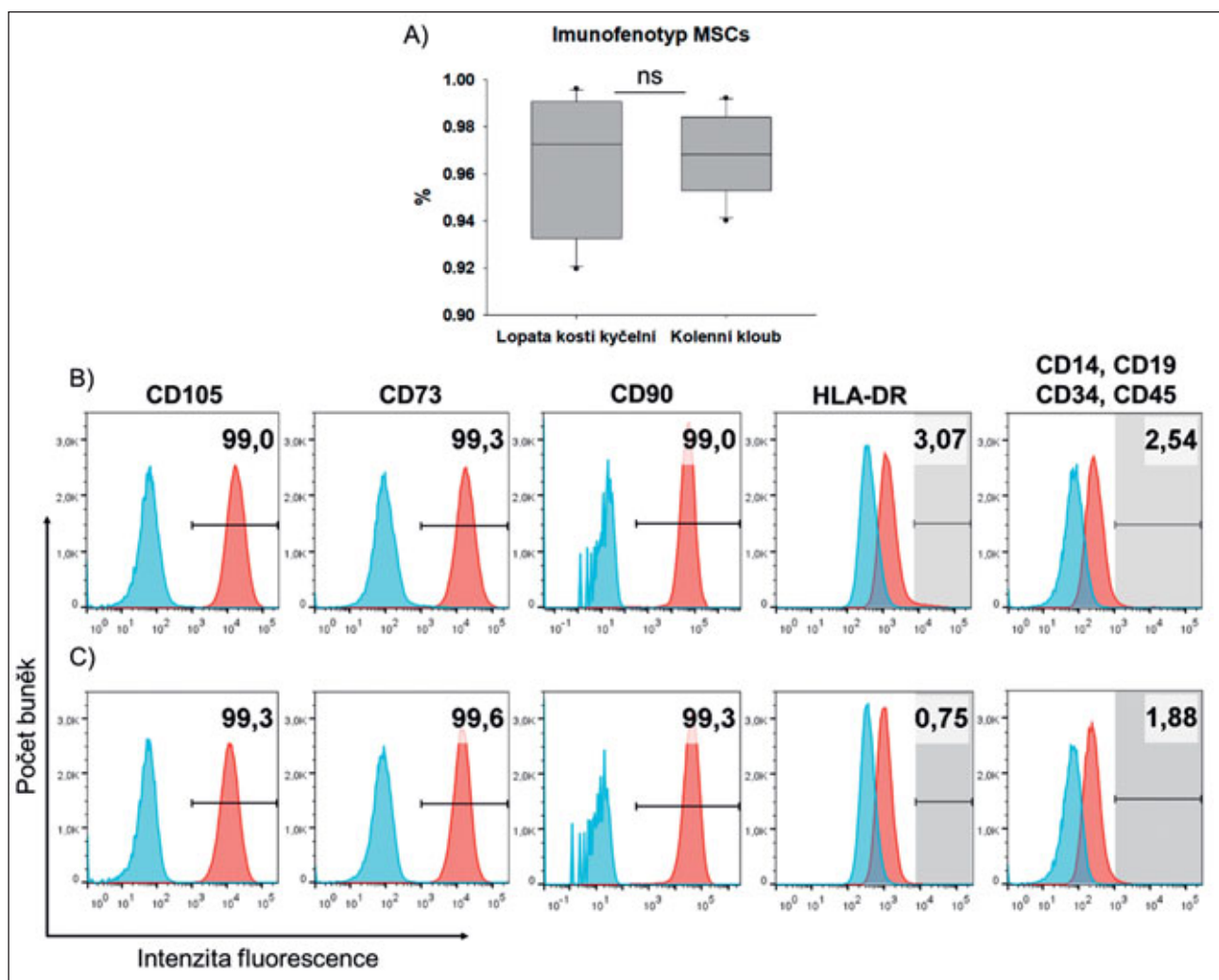
DISKUSE

Přestože operační zákroky stimulující kostní dřev jsou nejrozšířenější a nejlevnější operační technikou, výsledky nejsou uspokojivé, zejména z důvodu jejich krátkodobého účinku (20). Technika mikrofraktur, vycházející z Pridieho návrtů se stala široce užívanou metodou k ošetření chondrálních defektů kloubů včetně kolena, ramene a hlezna (20, 25, 27). Novotvořená fibrózní chrupavka vzniklá přeměnou koagula v ošetřeném defektu však nemá dlouhodobý klinický efekt, udává se 5–6 let (20). Ke zlepšení výsledku se začala používat technika mikrofraktur s překrytím defektu periostálním lalokem, chitosanem, kolagenem, nebo syntetickými materiály včetně kyseliny polyglykolové a kyseliny hyaluronové (8). Vzhledem k neuspokojivým výsledkům se do popředí zájmu dostala buněčná terapie, jejíž základní biologické aspekty byly předmětem naší práce.

Bylo prokázáno, že patomorfologický popis defektu pomocí klinicky běžně užívané klasifikace dle Outerbridge (22) koreluje s histologickými a histochemickými klasifikacemi poškození chrupavky (20). Související poškození subchondrální kosti vede k ztlustění zóny kalcifikující chrupavky, a tím ke snížení krevního zásobení, čímž se celý patologický proces umocňuje (16).

Nevyřešenou otázkou zůstává, zda je nízká dostupnost progenitorových buněk výsledkem nedostatečné distribuce buněk, resp. množstvím buněk v dané lokalitě, a zda je tento proces zodpovědný za nedostačující výsledky léčby poranění chrupavky u pacientů nad 40 let věku.

Výzkum ohledně využití progenitorových buněk v medicínské praxi stále probíhá a není tomu jinak ani v oblasti regenerace chrupavky (1, 18).



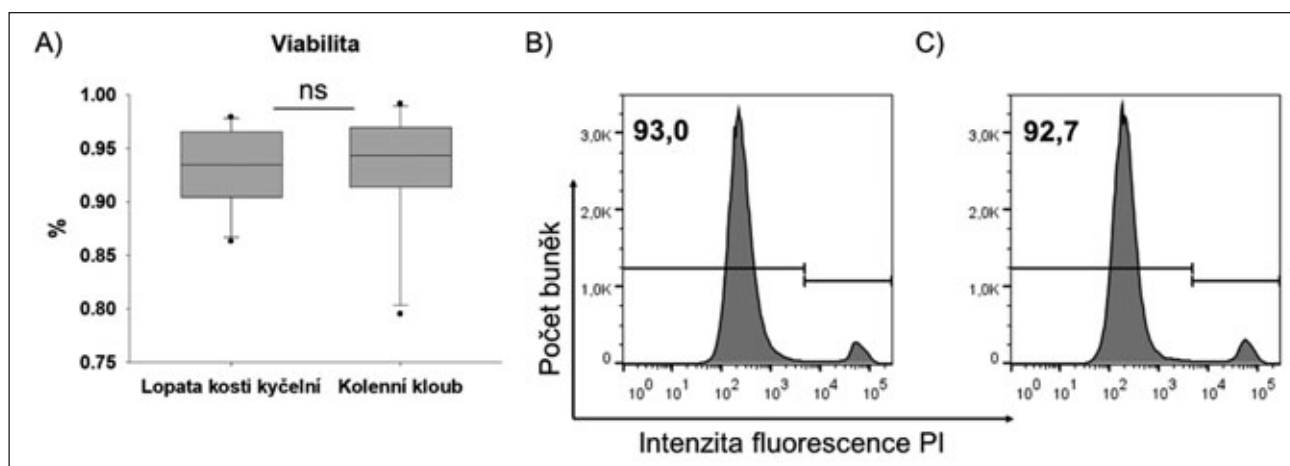
Obr. 3. Imunofenotypizace MSCs. A) Krabicový graf ukazuje srovnatelný fenotyp u obou odběrových míst včetně odlehých hodnot a mediánu ($n=10$; ns, nesignifikantní; chybové úsečky představují kvartily – 5–25 % a 75–95 %). Obrázky B) a C) zobrazují porovnání imunofenotypu buněk izolovaných z lopaty kosti kyčelní (B) a kolenního kloubu (C) vzhledem k negativní kontrole. Histogram na levé straně (modře) reprezentuje neznačenou (negativní) kontrolu, histogram na pravé straně (červeně) ukazuje značenou (pozitivní) populaci buněk. Hodnota nad úsečkou udává procentuální podíl populace pozitivní na daný znak. Fig. 3. Immunophenotypization of MSCs. A) The boxplot shows a comparable phenotype in both the harvest sites including the outliers and the median ($n=10$; ns, insignificant; the error bars represent quartiles – 5–25% and 75–95%). Figures B) and C) provide a comparison of immunophenotype of cells isolated from the iliac crest (B) and knee joint (C) as against the negative control. The histogram on the left (blue) represents the unstained (negative) control, the histogram on the right (red) shows the stained (positive) cell population. The value above the bar gives the percentage of population positive for the specific marker.

Kostní dřeň v oblasti pánve a metafýzy velkých kostí (distálního femuru, proximální tibie) obsahuje mononukleární buňky, jejichž subpopulace disponuje všemi charakteristickými znaky MSCs podle kritérií Mezinárodní společnosti pro buněčnou a genovou terapii (International Society for Cell & Gene Therapy, ISCT), včetně adherence k plastu, specifické imunofenotypizace a potenciálu k diferenciaci v alespoň tři typy buněk (chondro-, adipo- a osteocyty) (7).

Kultivované buňky z obou testovaných zdrojů kostní dřeně našich pacientů (z pánevní kosti a z oblasti proximální tibie) vykazovaly podobné imunofenotypy ve smyslu exprese povrchových znaků CD90, CD105, CD73. Spolu s absencí specifických hematopoetických znaků (CD34 a CD45) a leukocytárních markerů jsme

byli schopni s velkou pravděpodobností identifikovat získané buňky jako MSCs (7). Nalezené povrchové znaky jsou membránové markery, které nalézáme také u endoteliálních buněk a dávají nám možnost uvažovat o aktivitě MSCs v procesu angiogeneze a regenerace tkáně s poruchou krevního zásobení (např. hojení paklobu, avaskulární nekrózy) (13, 26).

Domníváme se, že získané poznatky nás opravňují uvažovat o jedinečné možnosti využití MSCs v terapii chondrálních defektů. Výskyt MSCs v populaci jaderových buněk kostní dřeně je velice nízký, udává se četnost kolem 1:10 000 až 1:100 000 buněk. V literatuře se uvádí, že, kostní dřeň pánevní kosti je nejbohatším zdrojem MSCs a tím také zdrojem MSCs po celou dobu života (3,13,18). Neexistuje mnoho publikací, které by se zabý-



Obr. 4. Viability MSCs. A) Krabicový graf poukazuje na statisticky nevýznamný rozdíl mezi viabilitou buněk izolovaných z lopaty kosti kyčelní a z kolenního kloubu u všech dárců včetně odlehklých hodnot a mediánu ($n=10$; ns, nesignifikanční; chybové úsečky představují kvartily – 5–25 % a 75–95 %). Histogramy ukazují oddělené populace buněk pozitivních a negativních na značení PI v případě buněk z lopaty kosti kyčelní (B) a kolenního kloubu (C). Číselné údaje uvádění procentuální zastoupení.

Fig. 4. Viability of MSCs. A) The boxplot shows a statistically insignificant difference between the viability of cells isolated from the iliac crest and knee joint in all donors including the outliers and the median ($n=10$; ns, insignificant; the error bars represent quartiles – 5–25% and 75–95%). The histograms show the separate populations of cells positive and negative for PI staining in case of cells from the iliac crest (B) and knee joint (C). Numerical data gives their representation in percentage.

valy výskytem MSCs v kostní dřeni v jiných anatomických lokalitách u člověka. McLain et al. (19) porovnali aspiráty kostní dřene obratlových těl a pánevní kosti. Závěr jejich studie ukázal vyšší koncentraci MNCs ze vzorku z obratlového těla ($19,8 \times 10^6/\text{ml}$) v porovnání s pánevní kostí ($16,9 \times 10^6/\text{ml}$). Mazzoca et al. (17) porovnávali koncentrace MNCs z oblasti proximálního humeru při defektu rotátorové manžety a zjistili jejich průměrnou koncentraci ($12,1 \times 10^6/\text{ml}$). Beitzel et al. (3) zkoumali koncentraci MNCs z metafýzy distálního femuru při operaci předního zkříženého vazů a zaznamenali hodnotu $13,5 \times 10^6/\text{ml}$. Námi zjištěné průměrné koncentrace MNCs ze získaného aspirátu z ilické kosti a proximální tibie byly $24,8 \times 10^6/\text{ml}$ respektive $5,5 \times 10^6/\text{ml}$. Tyto koncentrace byly obecně nižší, než je uváděno v literatuře a je to dáno zřejmě vyšším věkem pacientů našeho souboru. K podobnému závěru došel také výzkum Narbona-Carceles et al. (21), který porovnal množství MNCs z aspirátu z ilické kosti, distálního femuru a proximální tibie u pacientů indikovaných k totální endoprotéze. Snižování množství a schopnosti proliferace MNCs se zvyšujícím se věkem člověka bylo pozorováno i v několika dalších studiích (9, 30).

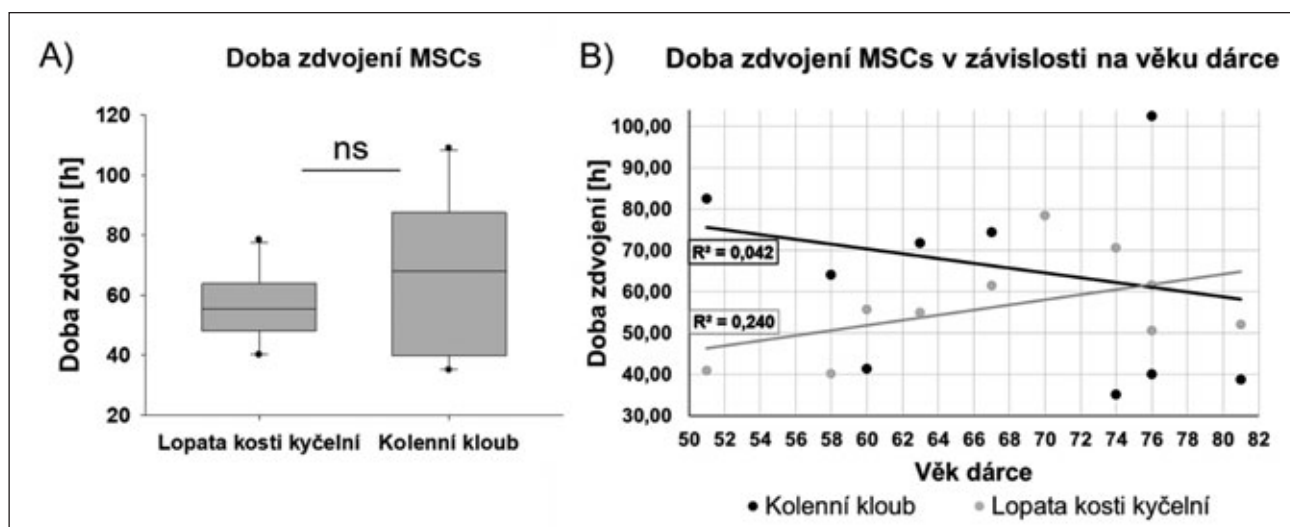
Úvahy o využití získaných autologních MNCs či MSCs získaných z kostní dřene k terapii chondrálních defektů se postupně začínají promítat do klinické praxe a jsou zkoumány v některých klinických studiích (18).

Cílem naší studie bylo, oproti jiným publikovaným pracím, analyzovat výtěžnost a kvalitu jak MNCs, tak MSCs kultivovaných z kostní dřene po odběru z proximální tibie. Důvodem volby této odběrové lokalizace je výrazné snížení zátěže pacientů odběrem kostní dřene, kdy je možné provést aspiraci materiálu z oblasti kolenního kloubu přímo během artroskopického zákroku. Zvolený inzertní bod v místě před předním zkříženým

vazem v oblasti interkondylické eminence je dobře přístupný ze standardních artroskopických portů, bez poškození vazů samotného. Získané buňky je pak možno použít k terapii diagnostikované chrupavčité léze. DeGirolamo et al. (6) publikovali výsledek léčby chondrálních defektů pomocí MSCs získaných z mikrofraktur kondylu femuru nebo plata tibie při artroskopii. Jejich práce jako jedna z prvních ukazuje na fakt, že MSCs je možné získat a kultivovat také z oblasti proximální tibie. Úspěšné kultivace MSCs z proximální tibie jsme dosáhli také v naší práci. Prokázali jsme, že není signifikantní rozdíl mezi množstvím získaných MSCs a viabilitou, jak se někteří autoři domnívají (13). Pro další výzkum bude potřeba zařazení většího počtu pacientů.

Z naší studie tedy vyplývá, že lze uvažovat o metafýze proximální tibie jako o vhodném zdroji kultivovaných MSCs. Je však nutno dodat, že nelze získat dostatečné množství progenitorových buněk z proximální tibie pro jednodobou operační terapii, kdy by byly implantovány nekultivované MNCs. I přes značné množství publikací stále neexistuje shoda ohledně množství MSCs nutných k léčbě specifické chondrální léze (18). V čem se s výsledky publikovaných prací shodujeme, je fakt, že je nutné MSCs kultivovat, abychom dosáhli dostatečného množství progenitorových buněk a tyto buňky implantovat až v rámci druhé operace.

Tato studie má jistě své limitace, mezi které patří nízký počet probandů (celkem 10 zkoumaných odběrů ze dvou zdrojů) a dále vyšší věk pacientů (průměr 55 let). Zároveň jsme nebyli schopni posoudit bolestivost odběru a míru možných komplikací samotného odběru kostní dřene z proximální tibie ve srovnání s odběrem z pánevní kosti (hemarthros, septické komplikace atd.), jelikož skupinu tvoří pacienti s implantovanou totální endoprotézou kolenního kloubu.



Obr. 5. Doba zdvojení MSCs. A) Krabicový graf ukazující dobu zdvojení (PDt) MSCs izolovaných z lopaty kosti kyčelní a kolenního kloubu včetně odlehklých hodnot a mediánu ($n=10$; ns, nesignifikantní; chybové úsečky představují kvartily – 5–25 % a 75–95 %). B) Graf závislosti hodnoty PDt na věku dárce pro MSCs odebrané z lopaty kosti kyčelní (šedě) a kolenního kloubu (černě) včetně hodnoty spolehlivosti R^2 . Korelační koeficient pro lopatu kosti kyčelní je roven hodnotě 0,49, pro kolenní kloub -0,20.

Fig. 5. Doubling time of MSCs. A) The boxplot shows the doubling time of (PDt) of MSCs isolated from the iliac crest and knee joint including the outliers and the median ($n=10$; ns, insignificant; the error bars represent quartiles – 5–25% and 75–95%). B) The graph of the dependence of PDt value on the age of the donor for MSCs harvested from the iliac crest (grey) and knee joint (black) including the value of reliability R^2 . The correlation coefficient is 0.49 for the iliac crest, -0.20 for the knee joint.

ZÁVĚR

Naše výsledky ukazují proč je kostní dřen z kyčelní kosti nejpoužívanějším zdrojem MNCs a MSCs pro různé buněčné terapie. Kostní dřen z této lokace je v porovnání s kostní dřen z oblasti proximální tibie mírně bohatší na MNCs a MSCs. Vybrané kvalitativní znaky – imunofenotypizace, viabilita, PDt, morfologie – však neukazují statisticky významný rozdíl mezi MSCs izolovanými z obou zdrojů. Z tohoto důvodu je možné považovat kostní dřen v oblasti proximální metafýzy tibie za vhodný alternativní zdroj pro izolaci MNCs a následnou kultivaci MSCs, s možným využitím v oblasti buněčné terapie chondrálních defektů, případně i v kombinaci s využitím 3D nosiče.

Poděkování

Autoři děkují všem dobrovolným dárcům kostní dřeně za jejich spolupráci. Dále pak patří dík dalším pracovníkům společnosti Bioinova, s.r.o., kteří se na projektu podíleli, jmenovitě I. Drahorádové, K. Růžickové, J. Káclové a H. Potočkové.

Literatura

- Akgun I, Unlu MC, Erdal OA, Ogut T, Erturk M, Ovali E, Kantarci F, Caliscan G, Akgun Y. Matrix-induced autologous mesenchymal stem cell implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation in the treatment of chondral defects of knee: a 2-year randomized study. Arch Orthop Trauma Surg. 2015;135:251–263.
- Andriacchi TP, Mundermann A, Smith RL, Alexander EJ, Dyrby CO, Koo S. A framework for the in vivo pathomechanics of osteoarthritis at the knee. Ann Biomed Eng. 2004;32:447–457.
- Beitzel K, McCarthy MB, Cote MP, Durant TJ, Chowaniec DM, Solovyova O, Russell RP, Arciero RA, Mazzocca AD. Comparison of mesenchymal stem cells (osteoprogenitors) harvested from proximal humerus and distal femur during arthroscopic surgery. Arthroscopy. 2013;29:301–308.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Eng J Med. 1994;331:889–895.
- Buckwalter JA, Mow VC, Ratcliffe A. I. Restoration of injured or degenerated articular cartilage. J Am Acad Orthop Surg. 1994;2:192–201.
- De Girolamo L., Bertolini G, Cervellini M, Sozzi G, Volpi P. Treatment of chondral defects of knee with one step matrix-assisted technique enhanced by autologous concentrated bone marrow: in vitro characterisation of mesenchymal stem cells from iliac crest and subchondral bone. Injury. 2010;41:1172–1177.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortebech I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8:315–317.
- Gao L, Orth P, Cucchiari M, Madry H. Autologous matrix-induced chondrogenesis: A systematic review of clinical evidence. Am J Sports Med. 2019;47:222–231.
- Garvin K, Feschuk C, Sharp JG, Berger A. Does the number or quality of pluripotent bone marrow stem cells decrease with age? Clin Orthop Relat Res. 2007;465:202–207.
- Gross AE, McKee NH, Pritzke KP, Langer F. Reconstruction of skeletal deficits at the comprehensive osteochondral transplant program. Clin Orthop Relat Res. 1983;174:96–106.
- Handl M, Trč T, Hanuš M, Štátný E, Fricová-Poulová M, Neuwirth J, Adler J, Havranová D, Varga F. Transplantace kultivovaných autologních chondrocytů hlezenného kloubu. Acta Chir Orthop Traumatol Cech. 2007;74:29–34.
- Hangody L, Füles P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: Ten years of experimental and clinical experience. J Bone Joint Surg Am. 2003;85(suppl 2):25–32.
- Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in

- nonunion and avascular necrosis bone. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87:896–902.
14. Kon E, Gobbi A, Filardo G, Decogliano M, Zaffagnini S, Marcacci M. Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesion of the knee: Prospective nonrandomized study at 5 years. *Am J Sport Med.* 2009;37:33–41.
 15. Kundrotas G, Gasperskaja E, Slapsyte G, Gudleviciene Z, Krasko J, Stumbryte A, Liudkeviciene R. Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow. *Oncotarget.* 2016;7:10788–802.
 16. Mankin HJ, Mow VC. Form and function of articular cartilage. In: Simon SR (ed.). *Orthopedic basic science.* American Academy of Orthopedic Surgeons, Rosemont IL, 1994.
 17. Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowanec DM, Cote MP, Arciero RA, Drissi H. Rapid isolation of human stem cells (connective tissue progenitor cell) from the proximal humerus during arthroscopic rotator cuff surgery. *Am J Sports Med.* 2010;38:1438–1447.
 18. McIntyre JA, Jones IA, Bo Han BA, Vangsness CT. Intra-articular mesenchymal stem cell therapy for the human joint: A systematic review. *Am J Sports Med.* 2018;46:3550–3563.
 19. McLain RF, Boehm CA, Rufo-Smith C, Muschler GF. Transpedicular aspiration of osteoprogenitor cells from the vertebral body: progenitor cell concentrations affected by serial aspiration. *Spine J.* 2009;9:995–1002.
 20. Mithoefer K, McAdams T, Williams, Kreuz PC, Mandelbaum BR. Clinical efficacy of mikrofracture technique for articular cartilage repair in the knee: An evidence-based systematic analysis. *Am J Sports Med.* 2009;37:2053–2063.
 21. Narbona-Carceles J, Vaquero J, Suarez-Sancho S, Forriol F, Fernandez-Santos ME. Bone marrow mesenchymal stem cell aspirates from alternative sources: Is the knee as good as the iliac crest? *Injury.* 2014;45:42–47.
 22. Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br.* 1961;43:752–757.
 23. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund ER, Lindhal A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med.* 2002;30:2–12.
 24. Podškubka A, Povýšil C, Kubeš R, Šprindrich J, Sedláček R. Ošetření hlubokých defektů chrupavky kolena transplantací autologních chondrocytů fixovaných na nosiči z esteru kyseliny hyaluronové (Hyalograft C). *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2006;73:251–263.
 25. Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritis knee joints. *J Bone Joint Surg Br.* 1959;41:618–619.
 26. Schmitt A, van Griensven M, Imhoff AB, Buchmann S. Application of stem cells in orthopedics. *Stem Cells Int.* 2012;2:394962.
 27. Siebold R, Lichtenberg S, Habermeyer P. Combination of microfracture and periosteal flap for treatment of focal full thickness articular cartilage lesions of the shoulder: a prospective study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2003;11:183–189.
 28. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee. Average 11 year follow-up. *Arthroscopy.* 2003;19:477–484.
 29. Wagner W, Bork S, Lepperdinger G, Joussen S, Ma N, Strunk D, Koch C. How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? *Aging.* 2010;2:224–230.
 30. Zaim M, Karaman S, Cetin G, Isik S. Donor age and long term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Hematology.* 2012;91:1175–1186.

Korespondující autor:

MUDr. Pavel Neckář
Ortopedické oddělení, oddělení sportovní medicíny
Krajská zdravotní, a.s.
Masarykova nemocnice
Sociální péče 3316/12A
401 13 Ústí nad Labem
E-mail: dr.neckar@gmail.com