



C E L L T H E R A P Y S E R V I C E

**Končno poročilo projekta
Razvoj tkivno inženirskih kostnih nadomestkov
(številka pogodbe TP MIR 06/RR/12)**

Pripravili:
dr. Nevenka Kregar Velikonja
dr. Hana Krečič Stres

Ljubljana, oktober 2008

KAZALO

1. Povzetek (Summary)	3
Summary	4
2. Uvod	5
2.1. Kostno tkivo, njegove poškodbe in celjenje	5
2.2. Tkivno-inženirstvo	6
2.3. Tkivno inženirski kostni nadomestki	6
2.4. Strateški in znanstveno-razvojni vidik	7
3. Rezultati in produkti	9
3.1. Izolacija in diferenciacija matičnih celic	10
3.1.1. Izolacija matičnih celic iz aspirata kostnega mozga	10
3.1.1.1. Ovrednotenje matičnih celic po analizi rasti krivulj	10
3.1.1.1.1. Tvorba kolonij v primarni kulturi mezenhimskih zarodnih	11
3.1.1.2. Ovrednotenje viabilnosti msc z analizo s pretočnim citometrom	12
3.1.1.3. Ovrednotenje izražanja celičnih označevalcev (CD profil) msc z analizo s pretočnim citometrom	12
3.1.2. Diferenciacija matičnih celic v kostne celice	13
3.1.2.1. Ovrednotenje diferenciacije celic na osnovi mRNA analize	13
3.1.2.2. Ovrednotenje diferenciacije celic na osnovi sposobnosti celic, da mineralizirajo medceličnino	14
3.2. Gojenje celic na nosilnem materialu	16
3.2.1. Testiranje različnih nosilnih materialov	16
3.2.1.1. Optimizacija nanosa celic na nosilni material	16
3.2.2. Priprava in dodatek trombocitnega gela – testiranje vpliva na celice	17
3.2.3. Gojenje pripravkov v bioreaktorju	17
3.2.3.1. Ovrednotenje pripravkov na osnovi fenotipskih lastnosti celic v celični kulturi ...	18
3.2.3.2. Ovrednotenje pripravka na osnovi števila celic	19
3.3. Priprava produkta za klinično uporabo	19
3.3.1. Ugotavljanje biomehanskih lastnosti kostnih nadomestkov	19
3.3.2. Izdelava postopka za kirurško aplikacijo	20
3.3.3. Razvoj oblike produkta	20
3.3.4. Kontrola postopka z vidika sterilnosti	21
3.3.5. Kontrola postopka z vidika odsotnosti bakterijskih endotoksinov	23
3.3.5.1. Rezultati preizkušanja apirogenosti celičnih kultur in vsadkov	25
3.3.6. Kontrola postopka z vidika genetske istovetnosti	26
3.3.6.1. Postavitev metode	27
3.3.6.2. Preskušanje vzorcev	27
3.4. Pridobitev pozitivnega mnenja Komisije RS za medicinsko etiko	28
3.5. Uporaba bioloških kostnih nadomestkov pri pacientih	28
3.5.1. Optimizacija kirurške metode	29
3.6. Klinična študija ter ovrednotenje kliničnih rezultatov	29
4. LITERATURA	31

KAZALO SLIK

Slika 1: Naraščanje števila celic v kolonijah primarne kulture MSC19 (k1-k27), nastalih iz posameznih pritrjenih celic.	11
Slika 2: Grafični prikaz rasti mezenhimskih matičnih celic 8 bolnikov v kulturi; p – pasaža ...	12
Slika 3: Grafični prikaz populacijskega podvojevanja mezenhimskih matičnih celic 8 bolnikov v kulturi; p - pasaža	12
Slika 4: Stopnja izražanja mRNA, značilnih za osteoblaste, v mezenhimskih matičnih celicah, ki so bile gojene v osteogenem gojišču glede na mezenhimske matične celice, gojene v osnovnem gojišču.....	14
Slika 5: Mezenhimske matične celice po osteogeni diferenciaciji in barvanju von Kossa.	15
Slika 6: Mezenhimske matične celice po osteogeni diferenciaciji in barvanju na alkalno fosfatazo.....	16
Slika 7: Izdelava končnega celičnega pripravka, ki se ga aplicira na mesto poškodbe dolge kosti.....	21
Slika 8: Prikaz aktivacije encima testa LAL.....	24
Slika 9: Prikaz načina aplikacije tkivno inženirskega kostnega nadomestka pri bolniku	29
Slika 10: Rentgenski posnetek stegenice bolnika M.Z. 6 mesecev po operaciji. Celjenje kosti se kaže v pojavu kostnega kalusa.	30

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled izvedbe projekta po nalogah v različnih fazah.....	9
Preglednica 2: Izražanje markerjev krvotvornih in mezenhimskih celičnih linij v frakciji s histopaguom izoliranih mononuklearnih celic kostnega mozga ter v kulturi mezenhimskih zarodnih celic.	13
Preglednica 3: Parametri preskušanja sterilnosti z metodo neposrednega zasajanja.	22
Preglednica 4: Količina bakterijskih endotoksinov v različnih vzorcih.....	26

1. POVZETEK

Kostne poškodbe nastanejo kot posledica neposrednega in posrednega delovanja sile, prav tako pa so lahko posledica dolgotrajnih preobremenitev. V primerih kot so zlomi z več kostnimi odlomki, primanjkljaj kosti, odprti zlomi ali ob slabi prekrvavitvi tkiv, je sposobnost kostnega tkiva po obnavljanju največkrat precej okrnjena. Zato se kost zarašča počasi ali pa se celo ne zaraste. Vojne poškodbe okončin in maksilofacialnih kosti predstavljajo indikacije, pri katerih bi ustrezna kirurška metoda, ki bi omogočila učinkovito obnovo (regeneracijo) tkiva, omogočila poškodovancem hitrejše zdravljenje in boljšo kvaliteto življenja po okrevanju.

Poškodbe, ki se slabo celijo, običajno potrebujejo ponovno kirurško oskrbo. Največkrat je to presaditev bolnikove lastne (avtologne) kosti, odvzete iz drugih delov telesa. Te kostnine pa pogosto ni dovolj na razpolago za zapolnitev celotne poškodbe, poleg tega pa se na odvzemnem mestu pojavljajo bolečine, poveča se možnost okužbe. Druga možnost je uporaba tuje (alogene) kostnine, ki je sicer dosegljiva v zadostnih količinah, a kot brezcelično tkivo služi samo kot začasna opora. Zaradi preprečevanja prenosa nalezljivih bolezni in imunskih reakcij je namreč potrebno celice v kostnini pred presaditvijo uničiti, največkrat z zamrzovanjem. Drugi načini premoščanja kostnih defektov so uporaba različnih polnilnih materialov (kalcijevi fosfati, različni polimeri). Omenjene materiale lahko uporabimo v trenutno najbolj aktualnem zdravljenju kostnih poškodb – to je s pomočjo tkivnega inženirstva. Tkivno-inženirski nadomestek tkiva lahko pripravimo v laboratoriju tako, da celice, ki smo jih izolirali iz vzorca zdravega tkiva, pomnožimo in nanesimo na nosilni material, ki celicam nudi prvotno oporo, omogoča razvoj tkiva ter vsaditev na mesto poškodbe.

Za pripravo tkivno-inženirskega kostnega nadomestka lahko uporabimo različne celice. Osteogene celice so tiste, ki so sposobne tvoriti kostno tkivo oziroma se lahko diferencirajo v celice s to sposobnostjo. Celice z osteogenim potencialom najdemo v različnih tkivih, zlasti v kosti, pa tudi v kostnem mozgu in maščobnem tkivu. V tkivih odraslega človeka namreč obstajajo poleg diferenciranih celic tudi matične celice, ki imajo sposobnost samoobnavljanja (kar omogoča pomnožitev njihovega števila) ter diferenciacije v različne vrste celic. Z uporabo že diferenciranih celic smo namreč omejeni na pripravo manjših tkivnih nadomestkov, saj je število gojenih celic odvisno od velikosti odvzetega biopsijskega vzorca in proliferacijskih sposobnosti celic. Matične celice pa nam omogočajo zdravljenje večjih poškodb kosti.

V naši študiji smo pripravili kostni nadomestek z uporabo matičnih celic, ki smo jih osamili iz kostnega mozga. Celice smo prenesli na predhodno testiran nosilni material in jih med gojenjem diferencirali v osteoblaste. Stopnjo diferenciacije smo spremljali z ocenjevanjem fenotipa celic. Osteoplastni fenotip celic smo pregledovali z določanjem izražanja značilnih proteinov kostnega matriksa, kot so: alkalna fosfataza, osteopontin, kostni sialoprotein II, kolagen tipa I ter z barvanjem celične kulture na prisotnost kalcijevih depozitov. Poleg tega smo ugotavljali tudi preživetje celic v pripravljenem vsadku.

Uporabnost produkta - tkivno-inženirskega kostnega nadomestka, ki smo ga pripravili v kontroliranih laboratorijskih pogojih, smo preizkusili v klinični študiji, ki je bila odobrena s strani Komisije RS za medicinsko etiko. Po do sedaj zbranih kliničnih rezultatih lahko sklepamo, da je tak način zdravljenja poškodb dolgih kosti potencialno uporaben, saj je bila pri vseh bolnikih po opisanem načinu zdravljenja opaženo nastajanje kostnine na mestu vsadka, več kot polovica zdravljenih pa že lahko obremenjuje zdravljenega nogo. Potek zdravljenja pri bolnikih bomo spremljali tudi v prihodnje, da bomo lahko še bolje ovrednotili uspešnost uporabljenega tkivno-inženirskega pristopa pri zdravljenju poškodb dolgih kosti.

SUMMARY

The healing potential of bone is mostly sufficient to restore the majority (simple) fractures, which are generally treated by standard conservative or surgical therapy. However, in some cases reparative osteogenesis does not result in structural and functional recovery of the bone. Extended bone defects following trauma or cancer resection or non-unions of fractures may require more sophisticated treatment. In these cases bone grafting procedures, segmental bone transport, distraction osteogenesis or biomaterials are applied for reconstruction. The repair of bone defects in reconstructive surgery is subject to significant limitations, including donor site morbidity, limited supply of autograft, risk of infection and immune rejection of allograft, and poor osteogenic effect of synthetic bone substitutes. In addition, bridging of a large bone defect by callus distraction requires a long time and usually an external fixator, both very inconvenient for the patients. Regardless of the technique used the percentage of failure is considerable. Therefore, bone repair is the subject of intensive investigation in reconstructive surgery.

The reconstruction of large bone defects is an important clinical problem, and none of the approaches thus far have proved very effective. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs or MSCs) – are progenitors of skeletal tissue components such as bone, cartilage, muscle, the hematopoiesis-supporting stroma, and adipocytes. These stem cells are present in many adult tissues; however they are most abundant in bone marrow and fat. Development of methods for isolation, expansion and controlled differentiation of BMSCs offers possibilities to use these cells as an integral component of various clinical applications of TE, especially in reparative osteogenesis. In animals, repair and functional recovery of segmental bone defects have been reported with the use of marrow-derived MSCs differentiated into osteoblasts and loaded onto the various scaffolds. There were also few reports about the treatment of critical-sized long bone defects with TE products using MSCs and scaffolds on humans (Quarto *s sod.*, 2001; Orozco *s sod.*, 2005).

In this project, a methodology for BMSC isolation, proliferation and differentiation as well as quality control procedures was established to use it in the clinical setting. In addition, a clinical trial to evaluate the concept of the autologous bone TE for the treatment of long bone defects has been carried out using autologous BMSCs differentiated into osteoblasts as a cell source and calcium triphosphate scaffold in combination with fibrin glue. The bone marrow was harvested from the patient's posterior iliac crest. BMSCs were isolated and expanded to the desired numbers. Osteogenic differentiation was carried out in confluent monolayer cultures of the second passage, which was confirmed by positive von Kossa staining (calcium deposits) and staining for the enhanced presence of alkaline phosphatase. In addition, higher gene expression levels of bone sialoprotein II, osteopontin and BMP2 were determined in BMSC after osteogenic differentiation compared to control BMSC. The cells were seeded directly onto the porous calcium-triphosphate granules (scaffold) to achieve approximately the total of 1×10^6 cells per 1 mL of the TE bone construct. The granules were "glued" by inducing fibrin clot formation with the addition of thrombin.

The autologous TE bone constructs were surgically implanted to fill the gaps of a long bone of each of the six patients. None of the patients has had any side effects connected to the treatment procedure. Preliminary results are promising as in all the patients new bone tissue formation was detected in the site of bone construct implantation. Half of the patients are allowed to fully bear load with the treated limb. Nevertheless, despite reports of successful implantation of TE bone tissues from clinical reports including our own, the small number of patients makes it very difficult to assess the efficacy of these constructs. The patients included in our clinical trial will be further evaluated.

2. UVOD

2.1. Kostno tkivo, njegove poškodbe in celjenje

Kostno tkivo sestavljajo kostna medceličnina in različne vrste celic: osteoblasti, osteociti, celice endoosteuma (bone-lining cells) in osteoklasti. Osteoblasti so najbolj aktivne sekretorne celice v kosti. To so diferencirane celice, ki se razvijejo iz stromalnih celic kostnega mozga ali mezenhimskih matičnih celic (msc), ki proliferirajo in se diferencirajo v pre-osteoblaste, nato v zrele osteoblaste in na koncu v osteocite. Izločati začnejo kolagen tipa I in nekolagenske proteine, ki so potrebni za izgradnjo mineraliziranega kostnega matriksa (Fleming in sod., 2000).

Kostne poškodbe nastanejo kot posledica neposrednega in posrednega delovanja sile, prav tako pa so lahko posledica dolgotrajnih preobremenitev. Kostno tkivo ima sicer zelo dobro sposobnost obnavljanja in celjenja, v redkih primerih (zlomi z več kostnimi odlomki, primanjkljaj kosti, odprti zlomi, slaba prekrvavitev tkiv) pa je ta sposobnost okrnjena, kar vodi v počasno zaraščanje (delayed-union) ali celo nezaraščanje kosti (non-union oz. pseudoartroza). Velikokrat v takšnih primerih pride še do bakterijskega vnetja na kosti (osteitisa). Takšna zapleti se pojavljajo med 0,5 do 15% kostnih poškodb, odvisno od spremljajočih lokalnih in sistemskih pogojev. Zdravljenje slabega preraščanja kosti je dolgotrajno, za bolnika neugodno, drago, poleg tega pa tudi končni rezultat (funkcija prizadete kosti) velikokrat ni zadovoljiv (Blease s sod., 2005, Keating s sod., 2005, Yazar s sod., 2004).

Prelomi, ki se slabo celijo, običajno potrebujejo ponovno (večkratno) kirurško oskrbo. Poleg očiščenja slabo celečega se dela kosti (debridement) in odstranitve prostih kostnih odlomkov (sekvestrektomija) ter ponovne notranje učvrstitve kosti (osteosinteza) moramo v predel zloma velikokrat dodati nadomestno kost, bodisi v obliki mehke kostnine (spongioza) ali celotne kostnine (kortikospongiozni transplantati). Presajena kost je lahko avtologna (bolnikova lastna odvzeta z drugih delov telesa (npr. iz medenice) ali homologna (odvzeta mrtvim darovalcem).

Bolnikova lastne kosti, ki je sicer najboljši nadomestek, pogosto ni dovolj na razpolago za zapolnjenje celotnega defekta. Poleg tega pa se na odvzemnem mestu lahko pojavijo določeni problemi: okužbe, bolečine, krvavitve, poškodbe živcev, brazgotine ipd. Problem pri uporabi tuje (homologne) kostnine, ki je sicer dosegljiva v zadostnih količinah, pa je v odsotnosti kostni celic – nosilce regeneracije kostnega tkiva. Zaradi preprečevanja prenosa nalezljivih bolezni in imunskih reakcij je namreč potrebno celice v kostnini pred presaditvijo uničiti, največkrat z zamrzovanjem. Takšna kostnina služi samo kot začasna opora in prehrana za lastno kostnino, ki jo kasneje prerašča. Zato je potencial celjenja preloma precej slabši kot pri uporabi avtologne kostnine (Blease s sod., 2005, Keating s sod., 2005, Yazar s sod., 2004).

Za premoščanje kostnih poškodb lahko služijo tudi umetni biokompatibilni materiali, ki imajo podobno funkcijo kot homologna kostnina; to so npr. kalcijevi fosfati, različni polimeri laktične in glikolne kisline. Tudi ti materiali so »mrtvi«, z ustreznimi postopki pa jih lahko uporabimo kot nosilce za celice z osteogenim potencialom, ki so sposobne pospeševanja obnove kostnega tkiva.

2.2. Tkivno-inženirstvo

Tkivno inženirstvo je hitro razvijajoča se veja biotehnologije, ki ponuja številne možnosti zdravljenja tkiv in se vse pogosteje obravnava kot del regenerativne medicine. To je interdisciplinarno področje, ki združuje principe tehnološkega inženirstva, naravoslovnih in medicinskih znanosti v smeri razvijanja bioloških nadomestkov, ki vračajo, ohranjajo ali izboljšujejo funkcijo okvarjenih tkiv in organov (Langer in Vacanti, 1993; Arosarena 2005). Biološke nadomestke pripravimo v laboratoriju tako, da celice naselimo na ustrezen nosilni material. Biološke nadomestke pripravimo iz celic, ki jih po izolaciji iz vzorca tkiva gojimo v celični kulturi. V nekaterih primerih, ko ni možno pripraviti celične kulture z enostavno izolacijo že diferenciranih celic, lahko uporabimo nediferencirane matične celice. Matične celice so nespecializirane celice in ostanejo takšne, vse dokler ne prejmejo iz okolice določenih signalov, ki usmerijo njihovo diferenciacijo. Najpogostejši vir matičnih celic pri odraslem človeku je kostni mozeg, ki vsebuje tako krvotvorne matične celice kot tudi zarodne celice mezenhimskih (vezivnih/strukturnih) tkiv. V zadnjem času pa je vedno več podatkov, da bi bilo lahko tudi maščobno tkivo zelo uporaben vir mezenhimskih matičnih celic.

Za celice, ki smo jih izolirali iz telesa, rast v celični kulturi na podlagi v enojnem sloju ni primerljiva z njihovim naravnim okoljem, kar se posledično odraža v spremembi fenotipa celic gojenih *in vitro*. Naravno okolje celicam veliko bolj približamo tako, da jih gojimo v tridimenzionalnih celičnih kulturah. Bistvenega pomena za pripravo tridimenzionalnih celičnih kultur so različne nosilne strukture, ki morajo poleg tega, da tvorijo ustrezno okolje za celice, imeti še vrsto drugih lastnosti. Tkivno-inženirski nadomestki zahtevajo posebne pogoje gojenja. Zaradi debeline in kompaktnosti tkivnih nadomestkov ne moremo uporabljati enostavnih načinov gojenja, saj proces difuzije ne omogoča ustreznega transporta hranil ter izmenjave plinov in odpadnih produktov. Statične metode gojenja celic zato nadomeščajo različne dinamične oblike, predvsem bioreaktorski sistemi, v katerih je izmenjava snovi povečana zaradi gibanja hranilnega medija.

2.3. Tkivno inženirski kostni nadomestki

Osteogene celice imenujemo tiste vrste celic, ki so sposobne tvoriti kostno tkivo oziroma se lahko diferencirajo v celice s to sposobnostjo. Celice z osteogenim potencialom najdemo v različnih tkivih, zlasti v kosti, pokostnici, maščobnem tkivu in kostnem mozgu (Griffith in Naughton, 2002; Fleming in sod., 2000). V tkivih odraslega človeka namreč obstajajo poleg diferenciranih celic tudi matične celice, ki so sposobne tako samoobnavljanja kot tudi diferenciacije. Te celice igrajo aktivno vlogo pri obnavljanju tkiv odraslega človeka, med drugimi tudi kostnega (Bjornson et al, 1999; Krause et al, 2001). V ustreznih pogojih *in vitro* se multipotentne mezenhimske matične celice lahko diferencirajo v različne vrste mezenhimskih celic: osteoblaste, hondrocite, adipocite (Pittenger in sod., 1999; Bianco in Robey, 2001). Zaradi velike sposobnosti pomnoževanja, pri čemer ne prihaja do izgube njihovega osteogenega potenciala, so te celice zanimive za pripravo tkivno inženirskih kostnih nadomestkov (Bruder in Fox, 1999). Z uporabo že diferenciranih celic smo namreč omejeni na pripravo manjših tkivnih nadomestkov, saj je število gojenih celic odvisno od velikosti odvzetega biopsijskega vzorca in proliferacijskih sposobnosti celic. Nadomestki pripravljeni iz diferenciranih celic so lahko uporabni pri nadomestitvi manjših količin kostnega tkiva, kot na primer pri obnovi maksilofacialne kosti (Turhani in sod., 2005; Zhu in sod., 2006; Schimming in Schmelzeisen, 2004). Matične celice pa bi lahko uporabili za zdravljenje večjih poškodb kosti (Frank, 2002; Lucarelli in sod., 2004).

Pri uporabi osteogenih celic v tkivnem inženirstvu moramo le-te identificirati in karakterizirati, kar je pri osteogenih celicah precej kompleksno. Najpogosteje označujemo osteoplastni fenotip celic z določanjem značilnih proteinov kostnega matriksa, kot so alkalna fosfataza,

osteopontin, kostni sialoprotein, osteonektin, osteokalcin in kolagen tip I. Izražanje teh proteinov je vezano na stopnjo diferenciacije celic v smeri osteogene linije. Alkalna fosfataza je pomemben pokazatelj normalnega osteoplastnega razvoja, vendar njeno izražanje ni omejeno le na kostne celice. Osteopontin proizvajajo preosteoblasti, osteoblasti in osteociti in ga izločajo v medceličnino, v večjih količinah na področjih, kjer poteka mineralizacija. Osteopontinu pravimo tudi "zgodnji" diferenciacijski označevalec, saj se njegova proizvodnja prične pred proizvodnjo osteokalcina. Osteokalcin je najpogostejši nekolagenski protein v kosti a ga lahko določimo šele v poznejših stopnjah diferenciacije osteoplastov (Cheng at all, 1996; Aubin, 1998, Fleming, 2000).

Kostne nadomestke je najbolje pripraviti iz avtolognih (bolnikovih) celic. Avtologne celice so za presaditve najprimernejše, saj ne izzovejo imunskega odziva. Celice po izolaciji iz odvzetega vzorca kostnega tkiva najprej v laboratorijskih pogojih pomnožimo, nato pa prenesemo v tridimenzionalno strukturno ogrodje. Površina nosilca mora biti taka, da se celice lahko pritrdijo. Poleg tega mora biti nosilec ravno prav zamrežen oziroma porozen, da se celice po nanosu lahko enakomerno razporedijo in pomnožujejo, hkrati pa mora biti dovolj trden, da nudi nadomestku mehansko oporo med gojenjem in vitro in po presaditvi v mesto poškodbe. Po presaditvi v telo se nosilna struktura postopoma razgrajuje, kostne celice s pomnoževanjem in tvorbo kostnega matriksa pa zapolnjujejo in regenerirajo (obnovijo) poškodovani deli kosti.

2.4. Strateški in znanstveno-razvojni vidik

Educell d.o.o. je visokotehnološko in inovativno podjetje, katerega dejavnost je na presečišču evropskih prioritet 'inovativne tehnologije' ter 'zdravje in znanost o življenju'. V podjetju Educell deluje raziskovalna skupina, ki se v svojih projektih močno povezuje z drugimi raziskovalnimi inštitucijami in s tem prispeva k dobremu raziskovalnemu in razvojnemu sodelovanju med podjetjem in raziskovalno sfero.

Tkivno inženirstvo je znanstveno razvojno področje, ki se v svetu zelo hitro razvija. Celične terapije, študije diferenciacije celic in raziskave matičnih celic so ena temeljnih razvojno-raziskovalnih usmeritev biomedicine v zadnjem desetletju. Potencial, ki ga nudijo različno difrencirane matične celice, je ogromen in z uporabo novih postgenomskih tehnologij in sitemske biologije dajejo odgovore na nekatera temeljna vprašanja. Potencial za aplikacijo je izjemno visok (kar odraža tudi mednarodna pobuda Bone and Joint Decade 2000-2010, www.boneandjointdecade.org), vključuje pa več panog in znanstvenih področij. V Evropi in svetu se predvidevajo znatni tehnološki preboji na področju regenerativne medicine v naslednjih 15 letih.

Zdravljenje s pomočjo tkivno inženirskih kostnih nadomestkov je aktualno področje raziskav za zdravljenje poškodb kosti, ki so posledica poškodb, tumorjev ali prirojelih bolezni. V klinični praksi že poteka preskušanje številnih tkivno-inženirskih kostnih nadomestkov za zdravljenje obzobne kosti, nekateri od njih so že tržno dostopni (produkt BioOss nemškega podjetja BioTissue). Tudi v našem podjetju smo v sodelovanju s stomatologi zaključili klinično študijo o učinkovitosti uporabe tkivno-inženirskega kostnega nadomestka (BoneArtTM-A) za zdravljenje obzobnih tkiv.

V primerjavi z zdravljenjem obzobnega kostnega tkiva je zdravljenje večjih kostnih poškodb na cevastih ali lobanjskih kosteh bolj problematično, predvsem z vidika velikosti vsadka in prehranjevanja novo nastajajočega tkiva ter potrebe po veliki količini celic za pripravo večjega nadomestka, ki naj bi po vsaditvi obnovile kostno tkivo. Iz biopsijskega vzorca kostnega tkiva namreč lahko pridobimo celice, ki jih v celični kulturi namnožimo, vendar je ta njihova sposobnost manjša kot pri matičnih celicah. Zato se kot potencialni vir celic za

pripravo tkivno inženirskih nadomestkov za zdravljenje kosti raziskujejo matične celice iz različnih virov, ki jih lahko v celični kulturi poljubno namnožimo: mezenhimske matične celice iz kostnega mozga, mezenhimske matične celice iz popkovnične krvi in embrionalne matične celice. Te raziskave so predmet številnih evropskih projektov. Mezenhimske matične celice iz kostnega mozga predstavljajo vir celic z osteogenim potencialom (sposobnostjo tvorbe kosti), ki so prisotne v kostnem mozgu odraslega človeka. Z uporabo teh celic za terapijo lahko zagotovimo avtologni značaj zdravljenja, s čimer se izognemo nevarnosti prenosa bolezni in zavrnitvenim reakcijam prejemnika.

Namen tega projekta je bil razviti tkivno-inženirski nadomestek za zdravljenje večjih poškodb kostnega tkiva, in sicer zdravljenje dolgih (cevastih) kosti. V razvoju nadomestka smo vpeljali številne izboljšave. Te izboljšave se kažejo predvsem v smislu inovativne uporabe vira celic. Iz aspirata kostnega mozga bolnika smo namreč osamili mezenhimske matične celice ter jih nato gojili do zadostnega števila, jih diferencirali v osteoblaste in jih nato prenesli na ustrezen nosilni material, ki se že klinično uporablja. Tendanca je bila razvoj popolnoma avtolognega kostnega nadomestka, zato smo avtologne mezenhimske matične celice gojili v gojiščih z avtolognim serumom. To je izredno pomembno s stališča varnosti uporabe tovrstnih nadomestkov za bolnika (uporabnika), saj se tako izognemo nevarnosti prenosa nalezljivih bolezni (predvsem virusov hepatitisa in HIV) ter možnosti zavrnitvene reakcije takega presadka. Celice v vsadku so bile sposobne vsaj v določeni meri tvoriti kostno tkivo, kar se je kazalo v izboljšanju uporabnosti bolnikove okončine, kjer se je nahajala poškodovana dolga kost. Nadaljnja klinična evalvacija je potrebna, da bi natančneje ocenili kakovostnejše celjenje poškodb in krajšo postoperativno rehabilitacijo pri opisanem načinu zdravljenja tovrstnih poškodb.

3. REZULTATI IN PRODUKTI

Rezultati projekta so prikazani glede na izvedene naloge v posameznih fazah, ki so opisane v preglednici 1.

Preglednica 1: Pregled izvedbe projekta po nalogah v različnih fazah.

Zap. št. faze, aktivnosti, naloge	FAZA / AKTIVNOST / NALOGA <i>(Opis)</i>	Začetek (datum)	Konec (datum)
Faza 1	Bazični razvoj		
1.1 Aktivnost	Izolacija in diferenciacija matičnih celic	1.8.2006	1.5.2007
1.1.1 Naloga	Primerjava vsaj dveh postopkov izolacije matičnih celic iz aspirata kostnega mozga.	1.8.2006	31.10.2006
1.1.1.1 Naloga	Ovrednotenje matičnih celic po analizi rastnih krivulj.	31.10.2006	31.10.2007
1.1.1.2 Naloga	Ovrednotenje matičnih celic po analizi s pretočnim citometrom; ovrednotenje viabilnosti	31.10.2006	1.5.2007
1.1.1.3 Naloga	Ovrednotenje matičnih celic po analizi s pretočnim citometrom ; ovrednotenje izražanja celičnih označevalcev (CD profil)	31.10.2006	31.10.2008
1.1.2 Naloga	Diferenciacija matičnih celic v kostne celice *	31.10.2006	31.10.2008
1.1.2.1 Naloga	Ovrednotenje diferenciacije celic na osnovi mRNA analize *	31.10.2006	31.10.2008
1.1.2.2 Naloga	Ovrednotenje diferenciacije celic na osnovi sposobnosti celic, da mineralizirajo matriks. *	31.10.2006	31.10.2008
1.2 Aktivnost	Gojenje celic na nosilnem materialu	1.5.2007	1.8.2007
1.2.1 Naloga	Testiranje različnih nosilnih materialov.	1.5.2007	1.7.2007
1.2.1.1 Naloga	Optimizacija nanosa celic na nosilni material.	1.5.2007	1.7.2007
1.2.2 Naloga	Priprava in dodatek trombocitnega gela – testiranje vpliva na celice	1.5.2007	1.7.2007
1.2.3 Naloga	Gojenje pripravkov v bioreaktorju.	1.5.2007	1.8.2007
1.2.3.1 Naloga	Ovrednotenje pripravkov na osnovi fenotipskih lastnosti celic.	1.5.2007	1.8.2007
1.2.3.2 Naloga	Ovrednotenje pripravka na osnovi števila celic.	1.5.2007	1.8.2007
1.3 Aktivnost	Priprava produkta za klinično uporabo	1.5.2007	1.8.2007
1.3.1 Naloga	Ugotavljanje biomehanskih lastnosti kostnih nadomestkov		
1.3.2 Naloga	Izdelava postopka za kirurško aplikacijo		
1.3.3 Naloga	Razvoj oblike produkta		

1.3.4 Naloga	Kontrola postopka z vidika sterilnosti		
1.3.5 Naloga	Kontrola postopka z vidika odsotnosti bakterijskih endotoksinov.		
1.3.6 Naloga	Kontrola postopka z vidika genetske istovetnosti.		
Faza 2	Aplikativni razvoj		
2.1 Aktivnost	Pridobitev pozitivnega mnenja Komisije za medicinsko etiko	1.8.2006	31.12.2006
2.2 Aktivnost	Uporaba nove kirurške metode aplikacije kostnega nadomestka pri pacientih.	1.8.2007	1.8.2008
2.2.1 Naloga	Optimizacija kirurške metode.	1.11.2007	1.10.2008
2.3 Aktivnost	Klinična študija ter ovrednotenje kliničnih rezultatov *	1.10.2007	31.10.2008

3.1. IZOLACIJA IN DIFERENCIACIJA MATIČNIH CELIC

3.1.1. Izolacija matičnih celic iz aspirata kostnega mozga

Primerjali smo dva različna postopka za izolacijo mezenhimskih matičnih celic iz aspirata kostnega mozga. Kot bolj učinkovit se je izkazal postopek, ki je opisan v nadaljevanju. Tega smo uporabili tudi za izolacijo msc iz vseh vzorcev, ki smo jih prejeli:

1. Aspiratu (1V) kostnega mozga smo dodali 3 dele (3V) DPBS (ali gojišča), da smo dobimo 4-kratno redčitev aspirata.
2. V 50 ml centrifugirke smo dali po 12,5 ml gostotnega gradienta Histopaque (gostota 1077 g / ml).
3. Z 10 ml serološko pipeto smo nanj previdno nanесли po 25 ml zredčenega aspirata. Nanašali smo tako, da se plasti nista mešali med seboj (ključno, da ne izgubimo celic).
4. Vse skupaj smo centrifugirali (2300 rpm, 15 min, brez zavore, nič pospeševanja).
5. Celice iz kostnega mozga se porazdelile glede na njihovo gostoto. Zgornjo plast (plazma) smo skoraj v celoti (3/4) previdno odpipetirali stran in jo zavrgli. Plast »beli obroček« pod plazmo vsebuje mononuklerane celice, kjer so tudi msc. Te celice smo previdno prenesli s pasteurjevo pipeto v svežo 50 ml centrifugirko. V eni smo združili celice iz 2 »obročkov«. Ostale plasti smo zavrgli. Dolili smo gojišče (DMEM-F12) do 50 ml.
6. Nato smo celice centrifugirali (1700 rpm, 10 min, normalna zavora in pospeševanje). Odlili smo supernatant in dolili gojišče (DMEM-F12) do 45 ml.
7. Vse skupaj smo spet centrifugirali (1700 rpm, 10 min, normalna zavora in pospeševanje). Odlili smo supernatant. Dolili smo gojišče (Advanced DMEM-F12) do 1 ml. Celice smo prešteli. Glede na število celic smo dolili gojišče (Advanced DMEM-F12) do volumna, v katerem je bilo 10^4 celic na ml (dobra naselitvena gostota) (npr. do 5 ml za 25 cm² posodo).

3.1.1.1. Ovrednotenje matičnih celic po analizi rastnih krivulj

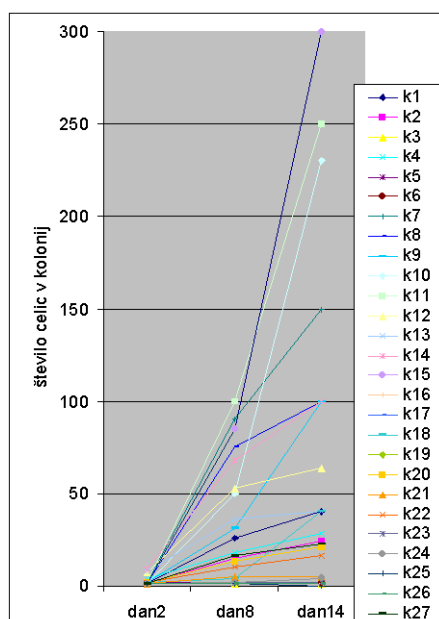
Mezenhimske matične celice po izolaciji iz aspirata kostnega mozga smo gojili v ustreznem gojišču in ob ustreznih pogojih (37 °C, 5 % CO₂). Ko je postala kultura konfluentna, smo celice tripsinizirali in prestavili v več posod. Pri tem smo celice prešteli. Na podlagi štetja celic

ob nasaditvi primarne kulture in vmesnega štetja ob prestavljanju celic (»pasažiranju«), smo lahko izdelali rastne krivulje.

3.1.1.1.1. Tvorba kolonij v primarni kulturi mezenhimskih zarodnih celic

Za primarno kulturo MSC je značilna kolonijska rast, vendar vse celice nimajo enakega klonogenega potenciala. Slika 1 ponazarja zelo različne hitrosti rasti posameznih kolonij. Kolonijsko rast smo spremljali 20 dni in celice v kolonijah šteli 2., 8., 14. in 20. dan. Dvajseti dan so bile hitro rastoče kolonije že prevelike za štetje celic, zato na grafu prikazujemo le rezultate do tretjega štetja (14. dan). Največjo stopnjo rasti (m) dosežejo kolonije v prvem tednu, ko le-ta znaša do 0,6 delitve/dan. Tej vrednosti pripadajoč podvojitveni čas je 1,7 dneva. V naslednjih tednih pa se stopnja rasti zmanjša.

Ugotovili smo, da se več kot tretjina pritrjenih celic ne deli oziroma, da je njihov podvojevalni čas daljši od 10 dni. Približno tretjina celic tvori počasi rastoče kolonije, ki vsebujejo po enem tednu 4-20 celic, njihov podvojevalni čas pa je 2,5 do 7 dni. Le približno četrtina celic pa tvori hitro rastoče kolonije s podvojevalnim časom, ki je manjši kot 2,5 dni. Klonogenost pritrjenih celic smo opazovali v dveh primarnih kulturah mezenhimskih zarodnih celic: MSC 19, v kateri smo opazovali 30 kolonij, in MSC24, v kateri smo opazovali 32 kolonij. V obeh primerih smo opazili podobno razmerje med različno hitro rastočimi kolonijami (slika 1).

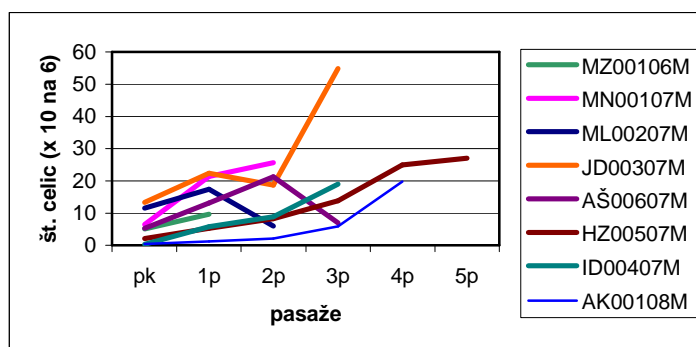


Slika 1: Naraščanje števila celic v kolonijah primarne kulture MSC19 (k1-k27), nastalih iz posameznih pritrjenih celic.

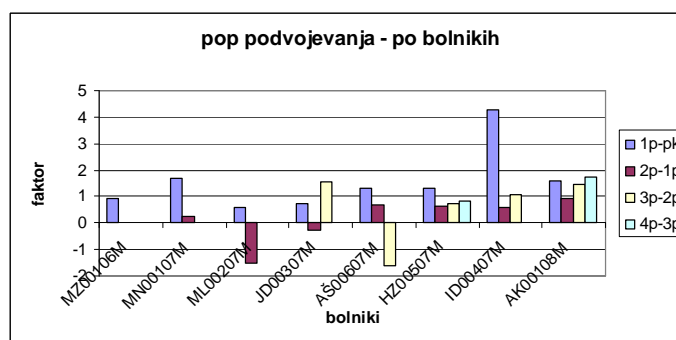
3.1.1.1.2. Rezultati analiz mezenhimskih matičnih celic bolnikov

Ovrednotili smo rast matičnih celic vseh 8 vzorcev kostnega mozga, ki smo jih prejeli od bolnikov. Od teh jih je 6 prejelo končni celični pripravek – tkivno inženirski kostni nadomestek. Celice vseh bolnikov so intenzivno rasle (sliki 2, 3). Hitrost rasti msc je bila primerljiva s hitrostjo rasti, ki je znana iz literature. Med posameznimi bolniki je so vidne razlike v dinamiki rasti njihovih msc. V nekaterih primerih pride v drugi ali tretji pasaži do padca rasti celične kulture, kar je pogosto opisano tudi v literaturi. Do tega pojava je prišlo

zaradi biološke raznovrstnosti bolnikov in optimizacij gojišč, kjer so msc rasle. Ugotavljamo, da je bila optimizacija gojenja msc uspešna.



Slika 2: Grafični prikaz rasti mezenhimskih matičnih celic 8 bolnikov v kulturi; p – pasaža



Slika 3: Grafični prikaz populacijskega podvojevanja mezenhimskih matičnih celic 8 bolnikov v kulturi; p - pasaža

3.1.1.2. Ovrednotenje viabilnosti msc z analizo s pretočnim citometrom

Mezenhimske matične celice smo po izolaciji iz aspirata kostnega mozga gojili tako, kot je opisano pod točko 1.1.1.1. Ko je postala kultura msc konfluentna, smo celice tripsinizirali in jih prestavili v več posod. Pri tem smo vzorec (10^5) celic pripravili za analizo s pretočnim citometrom. S to metodo smo lahko določili delež živih in mrtvih celic, pri čemer smo lahko pri živih celicah določili še delež tistih, ki so prešle v proces apoptoze, katerega končni rezultat je smrt celice. Torej, s to metodo smo ugotovili, koliko celic je v določenem trenutku sposobnih preživetja. Metodo smo optimizirali in začeli z analizami vzorcev. Analizirali smo vzorce celic pred njihovo nasaditvijo na nosilec, se pravi pred pripravo končnega celičnega pripravka. Povprečna vrednost živosti msc je bila 86,13 %, povprečna vrednost apoptotičnih celic pa 6 %.

3.1.1.3. Ovrednotenje izražanja celičnih označevalcev (CD profil) msc z analizo s pretočnim citometrom

Mezenhimske matične celice smo obdelali po enakem postopku kot je opisano pod točko 1.1.1.2. Pred analizo s pretočnim citometrom smo celice po posebnem protokolu označili s posebnimi protitelesi na celične označevalce CD73, CD90 in CD105, ki so značilni za msc. Na ta način lahko izračunamo delež msc v populaciji celic, izoliranih iz aspirata kostnega mozga.

Analiza izoliranih mezenhimskih zarodnih celic in izvorne populacije mononuklearnih celic kostnega mozga s pretočnim citometrom

Frakcija mononuklearnih celic, izoliranih iz kostnega mozga s pomočjo histopaqua, vsebuje poleg populacije mezenhimskih zarodnih celic tudi krvotvorne celice, levkocite, limfocite in monocite. Različne celične populacije izražajo markerje, ki so značilni za krvotvorno celično linijo: CD 34, CD43, CD45, CD38, CD11b, CD34 in CD 117 (preglednica 2).

Markerja CD90 (Thy-1) in CD105 (endoglin), ki ju izražajo multipotentne mezenhimske zarodne celice, zasledimo tudi pri majhnem deležu celic mononuklearne frakcije kostnega mozga. Takšne celice ne tvorijo homogene populacije, prav tako pa ne moremo izključiti možnosti nespecifične vezave protiteles in njihovega pritrjevanja na skupke celic. Mezenhimske zarodne celice, izolirane iz kostnega mozga in gojene v celični kulturi, izražajo na površini markerje CD 73, CD 90 in CD105. Pri teh celicah pa ne zaznamo markerjev, ki so značilni za razne celične frakcije kostnega mozga, npr. CD43, CD45, CD38, CD11b, CD34 in CD117. Prisotnost markerjev CD 73, CD 90 in CD105 smo potrdili tudi v vseh msc, ki smo jih izolirali iz kostnega mozga bolnikov.

Preglednica 2: Izražanje markerjev krvotvornih in mezenhimskih celičnih linij v frakciji s histopaquam izoliranih mononuklearnih celic kostnega mozga ter v kulturi mezenhimskih zarodnih celic.

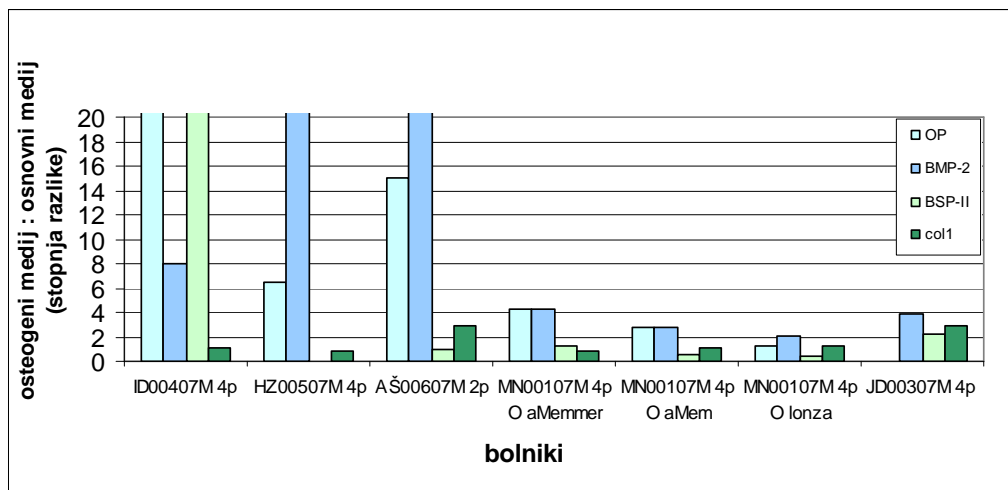
Markerska molekula	Mononuklearne celice	Kultura MSC
CD 90	-	+
CD 105	-	+
CD 34	++	-
CD 11b	+	-
CD 43	+	-
CD 45	+	-
CD 38	+	-
CD73	+	-
CD 117	++	-

3.1.2. Diferenciacija matičnih celic v kostne celice

3.1.2.1. Ovrednotenje diferenciacije celic na osnovi mRNA analize

V naših laboratorijih smo vzpostavili metodologijo za kvantitativno določanje stopnje izražanja za kostne celice specifičnih mRNA. Določali smo količino mRNA za osteopontin (OP: anotacija ABi: Hs00959009_m1), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2: anotacija ABi: Hs00173720_m1, Bone Sialoprotein II (BSPiI: anotacija ABi: Hs00173720_m1, kolagen 1 A1 (col1a: anotacija ABi: Hs00164004_m1), GAPDH (kot notranji uravnavni gen) iz sestava ABI in luciferaze (kot zunanji uravnavni gen; ABI: začetni oligi R: , začetni oligi F:, proba: luciferazna kontrolna RNA (Promega, Kataloška št. L456A: 2x10ul). Izražanje naštetih mRNA smo spremljali z metodo PCR v realnem času, s katero smo lahko natančno določili njihovo število. Uporabljali smo kemijski princip TaqMan® (Applied Biosystem, ZDA). Iz izbranih vzorcev celic smo najprej izolirali celokupno RNA, jo z reverzno transkripcijo prepisali v

cDNA in nato določili relativno količino tarčne cDNA (razmerje med količino tarčne cDNA in cDNA hišnega gena GAPDH, po postopku relativne kvantifikacije). Na sliki 4 so prikazani rezultati analiz, kjer smo primerjali stopnjo izražanja omenjenih mRNA, značilnih za osteoblaste, v mezenhimskih matičnih celicah, ki so bile gojene v osteogenem gojišču glede na mezenhimske matične celice, gojene v osnovnem gojišču. Ugotovili smo, da se je stopnja izražanja za kostne celice značilnih genov v msc, ki smo jih aplicirali na nosilcu na mesto poškodbe dolge kosti bolnikov, v povprečju precej povečala. Glede na to sklepamo, da je bil naš postopek diferenciacije msc v osteoblaste učinkovit.



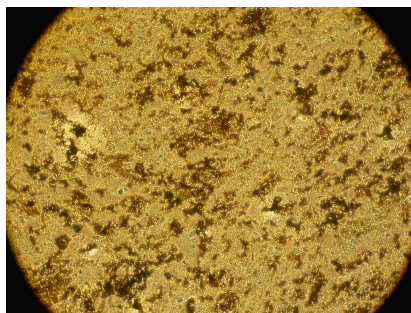
Slika 4: Stopnja izražanja mRNA, značilnih za osteoblaste, v mezenhimskih matičnih celicah, ki so bile gojene v osteogenem gojišču glede na mezenhimske matične celice, gojene v osnovnem gojišču.

3.1.2.2. Ovrednotenje diferenciacije celic na osnovi sposobnosti celic, da mineralizirajo medceličnino

Diferenciacijo mezenhimskih matičnih celic v osteoblaste, ki smo jih uporabili za aplikacijo pri zdravljenju poškodb dolgih kosti, smo preverjali z 2 različnima vrstama barvanja celičnih kultur, barvanjem po von Kossi (glej 3.1.2.2.1.) in barvanjem na alkalno fosfatazo (glej 3.1.2.2.2.). V vseh primerih smo dokazali, da so bile msc uspešno diferencirane v osteoblaste, ker smo dobili pozitiven rezultat po obeh postopkih barvanj.

3.1.2.2.1. Barvanje von Kossa

S tem barvanjem dokazujemo kalcijeve depozite v ekstracelularnem matriksu, ki ga izločajo osteogeno diferencirane msc. Kalcijevi depoziti se kažejo kot črne pike (kristali) med celicami. Če je kultura močno kalcificirana, se te kristale vidi kot črne pikice že brez mikroskopa (slika 5).



Slika 5: Mezenhimske matične celice po osteogeni diferenciaciji in barvanju von Kossa.

Opis postopka:

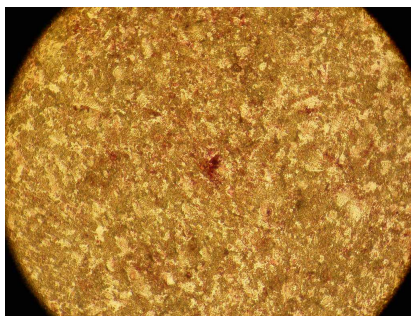
1. Odstranimo gojišče iz posodic (po navadi luknjic v 6-well ploščici ali 24-well- ploščici).
2. Luknjice speremo 2x z mrzlim (+4 °C) HBSS.
3. Raztopino fiksiramo s 3,7 % formaldehida (10 x redčen 37 % formaldehid v PBS) 30 minut na sobni temperaturi.
4. Luknjice speremo 2x z destilirano vodo.
5. Dodamo 2 % srebov nitrat (Fluka) in inkubiramo 10 minut na sobni temperaturi v temi.
6. Luknjice 3x spiramo z destilirano vodo.
7. Celice pustimo v vodi in jih izpostavimo močni svetlobi 15 minut na sobni temperaturi.
8. Luknjice speremo 2x z destilirano vodo.
9. Preparat fotografiramo.
10. Celice dehidriramo s 100 % EtOH 1 minuto (po želji).
11. Odstranimo EtOH in posušimo na zraku.
12. Celice prekrijemo s plastjo glicerola (po želji).

3.1.2.2.1. Barvanje na alkalno fosfatazo (ALP)

S tem barvanjem dokazujemo prisotnost encima alkalne fosfataze na membranah msc, ki se kaže kot roza barva (slika 6).

Opis postopka:

1. Odstranimo gojišče iz posodic (po navadi luknjic v 6-well ploščici ali 24-well- ploščici).
2. Luknjice speremo 2x s TBSS.
3. Celice fiksiramo z delovno raztopino citrata (priprava glej spodaj) in acetona (v:v = 60:40), 30 sekund na sobni temperaturi.
4. Luknjice speremo 2x z destilirano vodo. Vodo po drugem spiranju pusti na celicah, dokler nisi pripravljen na naslednji korak.
5. Celicam dodamo raztopino za obarvanje (mešanico naftol AS-MX alkalne raztopine in raztopine s fast Violet barvilom – priprava – glej spodaj) in jih inkubiramo 45 minut na sobni temperaturi v temi.
6. Odstranimo mešanico raztopin in celice 2x spiramo z destilirano vodo.
7. Vodo iz drugega spiranja pustimo na celicah, jih shranimo v temi. Lahko jih barvamo še na druge sestavine, npr. von Kossa barvanje.



Slika 6: Mezenhimske matične celice po osteogeni diferenciaciji in barvanju na alkalno fosfatazo.

3.2. GOJENJE CELIC NA NOSILNEM MATERIALU

3.2.1. Testiranje različnih nosilnih materialov

Nosilni umetni materiali (kostni nadomestki), ki se jih navadno uporablja za zdravljenje kostnih defektov so: kalcijev trifosfat, kalcijev sulfat, kalcijev karbonat, hidroksiapatit, demineralizirana kostnina, cement na osnovi stekla idr. Vsi so biokompatibilni in biorazgradljivi, kar pomeni, da so primerni za uporabo pri ljudeh.

V literaturi najdemo veliko podatkov o uporabi naštetih nosilnih materialov. Razvidno je, da se v praksi za nadomeščanje delov dolgih kosti najpogosteje uporablja kalcijev trifosfat. Travmatološka klinika KC Ljubljana že nekaj časa pri določenih indikacijah za zdravljenje oziroma nadomeščanje kosti rutinsko uporablja kalcijev trifosfat in ima z njim dobre izkušnje (dober oziroma zadovoljiv potek zdravljenja). Glede na podatke iz literature in izkušnje Travmatološke klinike smo se odločili, da v naš postopek priprave kostnega tkivno inženirskega nadomestka vpeljemo kalcijev trifosfat kot nosilec. V naših poskusih, kjer smo nanj nanašali celice in spremljali njihovo živost po določenem času, se je izkazal kot primeren nosilec za tovrstno aplikacijo. Ugotovili pa smo, da je njegova razgradnja po aplikaciji prepočasna glede na potencial nadomeščanja z lastno kostnino. Pri zadnjem bolniku smo zato uporabili kot nosilec alogeni liofiliziran kostni matriks in tudi v bodoče bomo uporabili ta pristop.

3.2.1.1. Optimizacija nanosa celic na nosilni material

Princip izdelave avtolognega tkivno inženirskega produkta je bil, da smo avtologne matične celice po izolaciji iz odvzetega vzorca kostnega mozga najprej pomnožili, diferencirali v osteoblaste (kostne celice), nato pa jih prenesli v tridimenzionalno okolje, na nosilni material (nosilec). Preizkusili smo več načinov za prenos celic na nosilec. Pred nasaditvijo na nosilec celice najprej tripsinizirali, t.j. odlepili od podlage v gojilnih posodah, kjer so rasle. Tako smo dobili celično suspenzijo.

Pri prenosu celic na nosilec je najbolj pomembna hitrost in nezapletenost postopka (da so celice izpostavljene čim manjši manipulaciji, kar ohranja njihovo živost in vitalnost). Glede na to smo se odločili za naslednjo tehniko: uporabili smo celično suspenzijo, v katero smo dodali raztopino fibrinogena in jo nato prenesli s pipetiranjem na granule trdnejšega nosilca. Z dodatkom trombina se je raztopina fibrinogena s celicami spremenila v fibrinski gel, v katerem so bile ujete celice. Tako smo dobili kompakten vsadek. S poskušanjem smo določili optimalna razmerja vseh komponent, ki jih uporabimo pri pripravi tkivno inženirskega

nadomestka, da dobimo primerno trdnost le-tega. Končno razmerje komponent, ki smo jih uporabili je bilo: 1 del trombina : 3,33 delov fibrinogena : 15,7 delov celične suspenzije v gojišču.

3.2.2. Priprava in dodatek trombocitnega gela – testiranje vpliva na celice

Trombocitni gel je izviral iz standardnega alogenskega trombocitnega koncentrata enega donorja, ki je bil ABO- in RhD. Pripravili smo ga iz 450 ml krvi, ki je vsebovala 70×10^9 trombocitov, in 50 ml citrirane plazme. Vse skupaj smo shranili v plastično vrečko, prirejeno za shranjevanje trombocitov, pri 20 – 24 °C na avtomatskem stresalniku 5 dni. Pri odpravi levkocitov s filtracijo smo izgubili 10-15 % trombocitov.

50 ml mešanice trombocitnega pripravka je vsebovala 25 ml rahlo stisnjene spongiozne kosti in 25 ml trombocitnega koncentrata s približno $1,4 \times 10^9$ trombocitov / ml, kar je približno 5-krat trombocitov, kot jih je navadno prisotnih v krvi. Celoten volumen pripravka je vseboval približno 30×10^9 trombocitov. Za aktivacijo trombocitov smo uporabili 1,5 ml trombina. Tako je nastal želatinast pripravek z ustrežno trdnostjo v 2 minutah. Ocenili smo, da bi bil tak pripravek ustrezen za potencialno aplikacijo v bolnika.

Zaradi lažje dostopnosti vzorcev smo preizkusili delovanje trombocitnega gela najprej na hondrocitih (hrustančnih celicah). Ugotovili smo naslednje:

- Rast hondrocitov, ki so bili zmešani s trombocitnim gelom, je bila hitrejša v primerjavi s klasičnim načinom gojenja celic.
- Optimalno razmerje med hondrociti in trombociti je bilo 1:100.
- Hondrociti, ki smo jih zmešali s trombocitnim gelom, ki smo ga pripravili s trombinom in CaCl_2 ali samo s CaCl_2 , so bili primerljivi glede na kvaliteto in kvantiteto celične rasti.

Ugotovili smo, da trombocitni gel povzroča intenzivno proliferacijo celic, medtem ko vpliv na diferenciacijo ni bil predvidljiv. Trombocitni gel je izjemno bogat z različnimi rastnimi faktorji, ki lahko vplivajo tudi na diferenciacijo. Pri pripravi kostnega tkivno inženirskega nadomestka pa je prav ustrezna (in predvidljiva) diferenciacija uporabljenih celic ključnega pomena. Zato smo se odločili, da za našo aplikacijo trombocitnega gela ne bomo uporabljali.

3.2.3. Gojenje pripravkov v bioreaktorju

Avtologne matične celice, ki jih izoliramo iz odvzetega vzorca kostnega mozga, smo nasadili na tridimenzionalno strukturo nosilca (kalcijev trifosfat). V gojilni posodi so rasle 48 ur. Potem smo tak pripravek vnesli v bioreaktor. Že po 24 urah je prišlo do približno 50 % razkroja pripravka zaradi delovanja mehanskih sil, ki nastajajo pri obračanju bioreaktorja. Ugotovili smo, da pripravkov, sestavljenih na tak način, v bioreaktorjih ne moremo gojiti.

Alternativa načinu gojenja celic na nosilcu v bioreaktorju je princip izdelave avtolognega tkivno inženirskega produkta, ki je opisan v poglavju 1.2.1.1. Avtologne matične celice, ki jih izoliramo iz odvzetega vzorca kostnega mozga, najprej pomnožimo. Ko je njihovo število zadostno, pri njih induciramo osteogeno diferenciacijo (t.j. diferenciacijo v kostne celice), nato pa te celice prenesemo v tridimenzionalno strukturno ogrodje (nosilec) ter vse skupaj povežemo s fibrinskim lepilom. Ugotovili smo, da tak način priprave kostnega nadomestka omogoča uspešno vsaditev in je s tehnološkega vidika primeren za klinično aplikacijo.

3.2.3.1. Ovrednotenje pripravkov na osnovi fenotipskih lastnosti celic v celični kulturi

V vsaki fazi gojenja mezenhimskih matičnih celic (msc) *ex vivo* smo redno preverjali morfološke značilnosti celic pod invertnim mikroskopom. Msc so v kulturi pritrjene na dno gojilne posode in jo v monosloju enakomerno preraščajo. Morfologijo smo preverjali tik pred menjavo gojišča ali tripsinizacijo in še naslednji dan.

Pred nasaditvijo celične kulture na nosilec smo ovrednotili morfologijo celične kulture kot sprejemljivo, če so celice preraščale dno posode v enakomernem oziroma neenakomernem monosloju ali tvorile skupke celic. Morfologijo celične kulture smo ovrednotili kot nesprejemljivo, če so se celice odlepljale ali če se je odlepil cel monosloj celic na robovih gojilne posode. V primeru nesprejemljive ocene morfologije, bi bilo potrebno izvesti dodatne analize viabilnosti celic in upoštevati rezultate analize celične živosti. Če bi bili ti v mejah sprejemljivosti, bi celično kulturo lahko uporabili za nasaditev na nosilec, v nasprotnem pa ne. Pri gojenju msc iz vseh vzorcev kostnega mozga smo morfologijo ocenili kot sprejemljivo.

Pred nanašanjem msc na nosilec, smo pri celicah še v enoslojni kulturi inducirali diferenciacijo v osteoblaste (kostne celice). Diferenciacijo msc v osteoblaste preverjamo z barvanjem von Kossa. Princip testa temelji na dejstvu, da je v matriksu, ki ga izločajo diferencirani osteociti, poleg kolagena I in nekaterih drugih proteinov tudi veliko kalcijevega fosfata, ki se nahaja v obliki kristalov hidroksiapatita in daje kostnini trdost ter togost. Srebrova redukcijska metoda je tradicionalen način za prikaz kalcijevega fosfata in karbonata. Srebro v srebrovem nitratu nadomesti kalcij v kalcijevi soli. Srebrova sol pod vplivom svetlobe reducira in izloči se srebrova kovina, ki je temne barve.

Po končanem barvanju smo celične kulture v gojilni posodi pregledali najprej makroskopsko, nato še pod invertnim mikroskopom. Diferenciacijo msc v osteoblaste oziroma osteocite smo ovrednotili kot: sprejemljivo, če smo v posodi s celično kulturo, ki je bila v osteogenem mediju opazili temne pege, pike, kristale, ..., v posodi s celično kulturo v kontrolnem gojišču pa ne. Za nesprejemljivo pa bi bila označena, če med posodo s celično kulturo, ki je bila v osteogenem mediju in posodo s celično kulturo v kontrolnem gojišču ne bi bilo razlik. Indukcija osteogene diferenciacije je bila uspešna pri celicah vseh bolnikov.

Pred aplikacijo tkvino inženirskega kostnega nadomestka v bolnika je bilo potrebno preveriti rast celic na nosilcu. Zato smo del takega nadomestka vedno testirali z barvanjem v raztopini MTT (tiazolil modro), s katerim smo preverjali živost celic v celičnem pripravku ter posredno tudi njihovo razporeditev. Metabolno aktivne celice so pretvorile rumeno obarvano barvilo MTT v tetrazolijevo sol, ki je temnejše barve in se nalaga na celični površini v obliki vijolično-črno obarvanih kristalov. Osteoblasti so se ob pravilnem nanosu celične suspenzije na nosilec pritrdili na zgornjo površino nosilca ali pa so bili v fibrinskem lepilu. Rast celic v celičnem pripravku smo ovrednotili kot:

- dobro, če so obarvane celice prekrivale celotno površino nosilca enakomerno;
- sprejemljivo, če se obarvane celice razraščale večinoma le po robu nosilca, v njegovi sredini pa jih je bilo malo ali pa jih ni bilo;
- slabo, če v sredini nosilca in na samem robu ni bilo celic oziroma so prisotne v zelo nizkem številu.

Rast osteoblastov na nosilcu smo označili kot ustrezno, če je bila ocenjena kot dobra ali sprejemljiva. V primeru slabe ocene rasti celic na nosilcu, se je potrebno posvetovati z zdravnikom – operaterjem. V vseh tkvino inženirskih kostnih nadomestkih, ki smo jih pripravili do sedaj, nam je uspelo zagotoviti tako dobro razporeditev celic v vsadku in sprejemljivo celično živost, kot tudi primerno stopnjo celične diferenciacije.

3.2.3.2. Ovrednotenje pripravka na osnovi števila celic

V literaturi obstajajo različni podatki o naselitveni gostoti celic v tkivno inženirskih kostnih nadomestkih. Glede na različne študije, smo se odločili, da je v naših pripravkih približno 1×10^6 celic / ml pripravka. Taka gostota naj bi zagotavljala zadostno število celic za terapevtsko delovanje, ob tem pa naj bi bila njihova stopnja preživetja v pripravku po aplikaciji v bolnika ustrezna. Zato je potrebno pred vsakim nanosom celic na nosilec določiti število celic v gojilnih posodah. To delamo z dvema metodama: s pretočnim citometrom in mikroskopsko.

Mikroskopsko ugotavljanje živosti in števila celic smo ugotavljali tako, da smo vzorec celične suspenzije obarvali s tripanskim modrilom, prenesli v števno komoro (hemocitometer) in pod mikroskopom prešteli žive in mrtve celice. Ker žive celice ne prepuščajo tripanskega modrila, so se intenzivno modro obarvajo le mrtve. Število celic smo izračunali glede na celokupni volumen celične suspenzije. Živost celic smo izrazili kot odstotek živih celic. Število in viabilnost celic sta morala ustrezati kriterijem, ki so opisani pri posameznih postopkih, ko izvedemo opisano analizo.

Za ugotavljanje živosti in apoptoze msc s pretočnim citometrom smo uporabili z aneksin V-FITC. Na ta način smo že v preteklosti kvantitativno ugotavljali odstotek apoptotičnih celic v vzorcu suspenzije avtolognih hondrocitov za transplantacijo. Princip temelji na lastnosti celic, da v zgodnjih fazah apoptoze izgubijo membransko asimetrijo. Pri apoptotičnih celicah se membranski fosfolipid fosfatidilserin prenese tudi na zunanji sloj membrane. Na fosfatidilserin se veže aneksin V-FITC. Propidijev jodid je standardna spojina za preizkus viabilnosti s pretočnim citometrom. Z njo razlikujemo žive od mrtvih celic. Žive celice ne prepuščajo propidijevega jodida, medtem ko so membrane mrtvih in poškodovanih celic zanj prepustne. Celice, ki se obarvajo pozitivno z aneksinom V-FITC in negativno s propidijevim jodidom, so apoptotične. Celice, ki se obarvajo pozitivno z aneksinom V-FITC in s propidijevim jodidom so v končni fazi apoptoze, nekrotične ali pa že mrtve. Celice, ki se ne barvajo z aneksinom V-FITC in s propidijevim jodidom, niso v procesu apoptoze in jih štejemo za žive. Zaželeno je, da je viabilnost celične populacije, ki je namenjena aplikaciji, več kot 85% in apoptoza manj kot 5%. Celice še ustrezajo kriterijem, če je viabilnost vsaj 75%. V vseh pripravljenih kostnih nadomestkih je izmerjena živost in apoptoza msc pred aplikacijo ustrezala opisanim kriterijem.

3.3. PRIPRAVA PRODUKTA ZA KLINIČNO UPORABO

3.3.1. Ugotavljanje biomehanskih lastnosti kostnih nadomestkov

V predhodnih študijah tkivno inženirskih nadomestkov za zdravljenje poškodb sklepnega hrustanca smo ugotavljali njegove biomehanske lastnosti z reometrom. Reometrija je primerna metoda v primeru, ko želimo analizirati biomehanske lastnosti materiala/tkiva, ki ima pretežno homogeno strukturo. Ob kombinaciji trdnih granul iz kalcijevega trifosfata in fibrinskega lepila meritve z reometrom niso relevantne in je metoda kot taka neprimerna. Glede na podatke iz literature smo se odločili, da je s stališča mehanske stabilnosti kostni nadomestek, izdelan po naših protokolih, ustrezen za aplikacijo. S kirurškega vidika mora material v kostnem vsadku nuditi oporo celicam v vsadku, medtem ko je poškodovana kost stabilizirana kirurško. Na kostni vsadek tako ni direktno obremenjen in vidik biomehanskih lastnosti ni bistvenega pomena.

3.3.2. Izdelava postopka za kirurško aplikacijo

Izguba kostnine je lahko posledica več dogodkov: poškodb, tumorjev, različnih priprojenih bolezni idr. Take defekte lahko zapolnujemo z alografi ali s kostnimi nadomestki. Kostne nadomestke razdelimo v 3 skupine: autografi (kost iz istega osebk), alografi in (kost iz drugega osebk iste vrste) ali ksenografi (kost iz osebk druge vrste).

Trenutno se v praksi najbolj uporablja (58 %) aplikacija autograftov (»zlati standard«). V približno 80 % je poseg uspešen. Vendar pa so stranski nezaželeni učinki takega pristopa precejšnji: dodatna poškodba na mestu odvzema kosti, bolečina na odvzemnem mestu, povečana možnost infekcije, možnost dodatne izgube krvi (zaradi katere je nujna transfuzija in zato večja možnost prenosa bolezni), dodatni stroški posega zaradi postopka odvzema. Približno 34 % kostnih nadomestkov v praksi predstavlja aplikacija alograftov. Donorji kostnine so lahko živi ali pa kadavri. Po navadi tako kost obdelajo tako, da je brez celic (da se zmanjša ali prepreči imunski odziv bolnika). Poseg je manj uspešen kot pri uporabi avtograftov, zelo veliko pa je tudi tveganje za prenos različnih bolezni. V nekaterih primerih (približno 8 %) pa se uporablja aplikacija umetnih materialov oziroma kostnih nadomestkov. To so: kalcijev trifosfat, hidroksiapatit, kalcijev karbonat idr. Dobra stran uporabe takih materialov je odsotnost tveganj za prenos bolezni z donorja na prejemnika ter neomejena količina, ki je na razpolago za zapolnitev defekta. Slaba stran uporabe takih nadomestkov pa je njihova nezmožnost, da prenesejo dolgotrajne in velike mehanske obremenitve, da so podvrženi obrabi, poškodbam, ... S časom se ne re-modelirajo v kostnino, ampak ostanejo nespremenjeni, kar ne omogoča popolne rehabilitacije bolnika. Kot alternativo omenjenim postopkom lahko uporabimo tkivno inženirski pristop. Za zdravljenje poškodb uporabimo nosilec (eden od naštetih kostnih nadomestkov), kamor smo pred tem nanесли kostne celice ali osteoblaste. Tak tkivno-inženirski pripravek lahko uspešno nadomesti manjkajočo kost tudi v primerih, kjer ostali »klasični« postopki niso bili uspešni.

Kirurški postopek aplikacije kostnega nadomestka z osteoblasti je bil podoben postopkom, kjer manjkajočo kost nadomeščajo z autografi, alografi oziroma kostnimi nadomestki. Razlika je v materialu, s katerim zapolnujemo defekt in v samem prenosu tkivno-inženirskega pripravka na želeno mesto. Najprej kirurg iz mesta defekta kosti odstrani vezivno tkivo in tudi robne dele kosti, vse do vitalne, dobro prekrvljene kosti. Sledila je fiksacija kosti s pomočjo osteosintetskega materiala. Po koncu fiksacije so kirurgi v defekt kosti vstavili matične celice bolnika na nosilcu iz umetnega nadomestka kosti. Sledilo je zapiranje kirurške rane.

3.3.3. Razvoj oblike produkta

Preizkusili smo več možnosti oblik za pripravo končnega produkta. Najprej smo testirali pritrjevanje mezenhimskih matičnih celic na nosilni material:

1. Granule nosilca (1.4-2.8 mm) smo namočili v suspenzijo matičnih celic in fibrinskega lepila (2:1),
2. Dodali smo 1 ml raztopine trombina (1:10 z DMEM F12),
3. Granule smo razrezali s skalpelom in celice obarvali z MTT-jem, da smo ugotavljali njihovo razporeditev in živost.

Na granulah ni bilo vidnih pritrjenih celic, vse so bile v gelu, zato smo postopek prilagodili tako, da smo granule pred dodajanjem fibrinskega lepila predhodno namakali 1 uro v Bistvene razlike ni bilo. Postopek smo ponovili, s tem da smo polovico celične suspenzije predhodno nanесли na granule in jih inkubirali 3 ure, drugo polovico smo vmešali v fibrinsko lepilo in dodali granulam. Nato smo dodali zraven še raztopino trombina. Pripravek smo prerezali in obarvali z MTT-jem. Večina celic se je nahajala v gelu, posamezne celice pa tudi

na robovih prerezanih granul. Postopek smo ponovili še enkrat. Granule nosilca smo dali v 2,5 ml stekleno vialo in dodali približno 600 μ l celične suspenzije. Potem smo z 20 ml siringo naredili vakuum, da je šla suspenzija celic v pore nosilca. Dodali smo MTT in zopet naredili vakuum, da bi šel MTT v pore in obarval celice. Na površini nosilca so bile celice pritrjene, poleg tega pa so bile vidne tudi v suspenziji okrog nosilca. Ko smo prerezali granule nosilca, celic v njihovi notranjosti nismo videli. Odločili smo se, da je po tem postopku razmerje med celicami na površini nosilca in v gelu ustrezno, ker je tudi iz literature razvidno, da so celice v vsadkih, ki vsebujejo granule s podobno poroznostjo, razporejene predvsem v fibrinskem lepilu.

Končni postopek za izdelavo kostnega nadomestka je bil sledeč:

Najprej smo izbrali primerno količino (volumen) granul nosilca (1,4 – 2,8 mm) in jih prenesli v sterilno 150 ml posodo ter zraven dodali gojišče. Na posodo smo privili filter in 15 min vakuumsko prečrpavamo gojišče. Na ta način smo se znebili zračnih mehurčkov v porah nosilca, s čimer smo omogočili boljše pritrjanje celic na nosilec. Tako tretirane granule smo prenesli v eno ali več luknjic 6-well ploščice (spodaj je primer za 2 luknjici). Luknjice smo napolnili do 0,4 višine. Nanje smo prenesli približno polovico celične suspenzije. Inkubirali smo 10-15 minut. Preostanku celic smo dodali: 2V serumskega osteogenega gojišča in 1V fibrinogena. Volumen te raztopine je prekril skoraj vse granule. Potem smo zmešali 1V trombina in 9V osteogenega gojišča. Končno razmerje sestavin je bilo 1 del trombina : 3,33 delov fibrinogena : 15,7 delov gojišča. Po dodatku vseh komponent se je mešanica raztopin strdila in zlepila granule nosilca ter celice v kompakten tkivno inženirski pripravek (slika 7), ki je bila nared za aplikacijo na mesto defekta kosti.



Slika 7: Izdelava končnega celičnega pripravka, ki se ga aplicira na mesto poškodbe dolge kosti.

Določali smo tudi optimalno konsistenco celičnega pripravka. V najmanjšo plastično petrijevko (35 mm) smo dali 15 granul nosilca (1.4-2.8 mm), ki so prekriale cca. 2/3 površine v eni plasti. Z raztopino fibrinskega lepila (2:1) smo oblili granule (2 ml raztopine), dodali smo raztopino trombina. Nastali gel z granulami smo lahko prenesli s pinceto v drugo plastično posodo. Po dodatku trombina se premer pripravka ni skrčil. To je bil znak, da je konsistenca izdelka prava, ker se ga da prenašati iz enega mesta na drugo, ne da bi se pri tem poškodoval.

3.3.4. Kontrola postopka z vidika sterilnosti

Gojišča človeških celičnih kultur so različne sestave. Lahko vsebujejo protimikrobna sredstva (npr. gentamicin) ter antimikotike (npr. fungizon), ki zavirajo rast bakterij in gliv. Vsa gojišča vsebujejo tudi človeški serum, katerega sestavine lahko vplivajo na rast bakterij in gliv. V skladu s Ph. Eur. (2.6.1) je potrebno ovrednotiti vpliv gojišča (preiskovanega vzorca) na rast mikroorganizmov in potrditi ustreznost postopka za preskušanje sterilnosti. Z metodo neposrednega zasajanja v skladu s Ph. Eur. (2.6.1) smo preskušali sterilnost gojišč človeških

celičnih kultur. Namen naloge je bil dokazati ustreznost postopka za preskus sterilnosti gojišč celičnih in tkivnih pripravkov z metodo neposrednega zasajanja ter postaviti ustrezno shemo vzorčenja.

Validacija postopka testiranja sterilnosti

Pri metodi neposrednega zasajanja imamo na razpolago dva pristopa za odpravo protimikrobnega učinka preskušane vzorca: redčenje vzorca in uporabo različnih inaktivatorjev. Odločili smo se za prvi pristop. Pri metodi neposrednega zasajanja serijam epruvet z mikrobiološkima gojiščema (tekoče tioglikolatno gojišče - TYO in gojišče soja kazein TSB) dodamo predpisane alikvote preskušane vzorca ter jih inkubiramo pri predpisani temperaturi 14 dni (preglednica 3).

Preglednica 3: Parametri preskušanja sterilnosti z metodo neposrednega zasajanja.

Vzorec / Klinične značilnosti	Standardna gojišča	Količina inokuliranega vzorca	Inkubacija			Pregled gojišč (frekvenca)
			T (°C)	atmosfera	čas	
gojišča celičnih kultur	1x TYO (7 ml)	0,8 ml	35 °C	navaden inkubator	14 dni	vsakodnevno
	1x TSB (5 ml)	0,5 ml	20-25°C	delovni pult		

Gojišča smo opazovali med inkubacijo, in sproti beležili rezultat (morebiten pojav kolonij) vsak dan oziroma najmanj 3., 7., 10. in 14. dan inkubacije. Med opazovanjem tioglikolatičnih gojišč nismo premešali, ker bi z mešanjem uničili anerobne pogoje. V primeru rasti mikroorganizmov gojišča postanejo motna. Tioglikolatno gojišče smo 14. dan dobro premešali, da lahko zaznamo vsako rast. Če že sam vzorec povzroča motnost gojišča in po 14 dneh inkubacije ne zaznamo rasti, ocena pa je zaradi motnosti težavna, lahko po 14 dneh inkubacije najmanj 1 mL gojišča prenesemo v novo gojišče enake sestave in inkubiramo najmanj 4 dni:

- Če ne zaznamo rasti mikroorganizmov, vzorec ustreza predpisom preskušanja sterilnosti.
- Če zaznamo rast mikroorganizmov, vzorec ne ustreza predpisom preskušanja sterilnosti, razen če smo nedoumno dokazali, da preskušanje ni bilo ustrezno.

Celične kulture, namenjene re-implantaciji oziroma klinični uporabi, morajo ustrezati predpisom preskušanja sterilnosti v skladu s predpisi veljavne Evropske farmakopeje (Ph. Eur.). Zaradi specifičnih lastnosti celičnih kultur (končna sterilizacija ni mogoča, rok uporabnosti je zelo omejen) smo vzorčili gojišča celičnih kultur v vseh kritičnih stopnjah proizvodnje. Vzorčili smo iztrošeno gojišče (vsaj 3 dni v celični kulturi) v aseptičnih pogojih v sterilni vsebnik. Vzorčili smo najmanj 5 mL gojišča oziroma celotno gojišče celične kulture. Vzorčili smo v sterilne vsebnike v aseptičnih pogojih.

V procesu gojenja celičnih kultur mezenhimske matične celice in priprave celičnih nadomestkov smo uporabili naslednje vrste gojišč:

- K1: gojišče humane celične kulture (Gibco) s serumom (6% humani serum), gentamicinom (končna konc.: 0,05 mg/mL) in (amfotericin, končna konc.: 0,002 mg/mL).
- K2: gojišče humane celične kulture (Cambrex) s serumom (6% humani serum), gentamicinom (končna konc.: 0,05 mg/mL) in (amfotericin, končna konc.: 0,002 mg/mL).

- K3: diferenciacijsko osteogeno gojišče (Cambrex) humane celične kulture s serumom (2,5% humani serum), gentamicinom (končna konc.: 0,05 mg/mL) in fungizonom (amfotericin, končna konc.: 0,002 mg/mL).

Namen postavitve metode kontrole sterilnosti je bil zagotoviti nadzor celotnega postopka priprave končnega produkta (od prevzema aspirata kostnega mozga do izdaje končnega produkta). Nadzor sterilnosti je ključnega pomena, saj zaradi specifične narave končnega produkta (žive celice kot glavna učinkovina) nobena metode sterilizacije ni možna. Na štirih različnih celičnih kulturah smo postavili sistem vzorčenja ter preskušanja sterilnosti gojišč. Vzorčili smo iztrošena gojišča tipa K1, K2 in K3 ter izpirek epruвет aspirata kostnega mozga. Tip vzorca ni vplival na potek analize. V celotnem procesu gojenja celičnih kultur ter priprave končnega produkta smo analizirali povprečno med 15 in 25 različnih vzorcev. Od dolžine posamezne stopnje postopka je bilo odvisno število vzorcev. Analizirali smo sledeče vzorce:

- vzorec izpirka epruвет aspirata kostnega mozga;
- vzorec K1 in / ali K2: 2 - 4× vzorčenje;
- vzorec K3: 1 - 3× vzorčenje.

Če ne zaznamo rasti mikroorganizmov, vzorec ustreza predpisom preskušanja sterilnosti in celične kulture lahko uporabljamo v nadaljnjih postopkih. V primeru rasti mikroorganizmov, mikroorganizem izoliramo ter tipiziramo. Take celične kulture nemudoma izločimo iz procesa ter jih zavržemo. Pri vzpostavljenem načinu gojenja celičnih kultur ter priprave končnega produkta težav s sterilnostjo celičnih kultur nismo zaznali v nobene vzorcu. Z zgoraj opisanim sistemom vzorčenja smo zagotovili ustrezní nadzor celotnega postopka gojenja celic od začetka do konca.

Testiranje sterilnosti pri vzorcih za klinično naplikacijo

Pri vseh celičnih kulturah smo po zgornjem postopku dobili negativen rezultat preizkušanja sterilnosti

3.3.5. Kontrola postopka z vidika odsotnosti bakterijskih endotoksinov

Ugotavljanje prisotnosti bakterijskih endotoksinov v celičnih pripravkih uporabljamo rutinsko v končni kontroli kakovosti celičnih pripravkov. Zaradi specifičnih lastnosti celičnih pripravkov (majhne količine serije) ne moremo vzorčiti končnega pripravka, ampak vzorčimo v zadnjih stopnjah priprave.

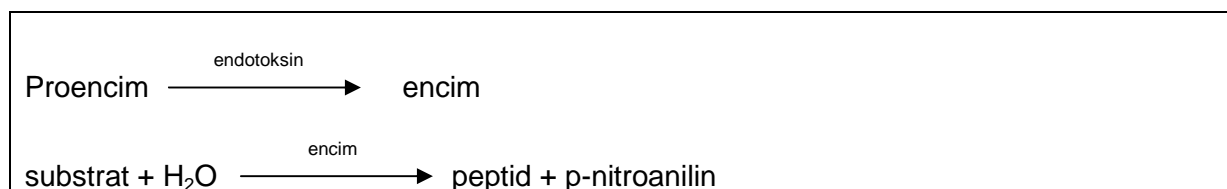
Končni celični izdelki lahko vsebujejo le nadzorovano količino bakterijskih endotoksinov. Tako lahko bolnik prejme do 5,0 EU bakterijskih endotoksinov v eni uri na kilogram telesne teže (predpis Evropske farmakopeje, 5. izdaja, za parenteralna zdravila, ki ne prihajajo v stik z cerebrospinalno tekočino. Dovoljene meje za vsebnost endotoksina (Ph.Eur):

1. Izpirek oziroma izvleček medicinskega pripomočka, ki ne prihaja v stik s cerebrospinalno tekočino, ne sme vsebovati več kot 0,5 EU/ml endotoksina.
2. Izpirek oziroma izvleček medicinskega pripomočka, ki prihaja v stik s cerebrospinalno tekočino, ne sme vsebovati več kot 0,02 EU/ml endotoksina.
3. Parenteralna zdravila: če v Ph.Eur. ni drugače predpisano, je največja dovoljena količina 5,0 EU/kg/Hr (pri 70 kg človeku to predstavlja 350 EU v 1 uri) pri zdravilu, ki ne prihaja v stik z cerebrospinalno tekočino.

4. Parenteralna zdravila: če v Ph.Eur. ni drugače predpisano, je največja dovoljena količina 0,2 EU/kg/Hr (pri 70 kg človeku to predstavlja 14 EU v 1 uri) pri zdravilu, ki prihaja v stik z cerebrospinalno tekočino.

Upoštevajte povprečno telesno težo (70 kg) ter enkratno odmerjanje končnih celičnih izdelkov lahko le-ti vsebujejo do 350 EU v celotnem odmerku. Kinetic – QCL je kvantitativen kinetični kromogeni test za določanje prisotnosti Gram negativnih bakterijskih endotoksinov. Princip testa temelji na ugotovitve, da infekcija rakovice (*Limulus polyphemus*) z Gram negativnimi bakterijami povzroči smrtno nevarno intravaskularno koagulacijo. Koagulacija je posledica reakcije med bakterijskim endotoksinom in koagulirajočo beljakovino, ki je v krožecih amebocitih rakovice. Z razvojem primernega antikoagulant za kri rakovice so pripravili lizat iz očiščenih amebocitov, ki je zelo občutljiv na prisotnost endotoksina. Z čiščenjem in določitvijo koagulirajoče beljakovine iz lizata so dokazali, da je kinetika reakcije encimska.

LAL test predstavlja začetni del celotne endotoksinske reakcije, ko preide do aktivacije encima, kateri nato iz dodanega substrata sprosti p-nitroanilin, ki je rumene barve (slika 8).



Slika 8: Prikaz aktivacije encima testa LAL.

Endotoksin Gram negativnih bakterij katalizira aktivacijo proencima iz lizata (LAL). Začetna stopnja aktivacije je določena z koncentracijo prisotnega endotoksina. Aktiviran encim katalizira cepitev p-nitroanilina (pNA) iz brezbarvnega substrata (Ac-Ile-Glu-Ala-Glu-Ala-Arg-pNa). Sproščanje pNA kontinuirano merimo fotometrično pri 405 nm med celotno inkubacijsko dobo. Koncentracijo endotoksina izračunamo iz reakcijskih časov standardne umeritvene krivulje. Pri vsakem testu moramo uporabiti umeritveno krivuljo endotoksinskega standarda, negativno kontrolo (LAL voda), pozitivno kontrolo (to lahko predstavlja kar umeritvena krivulja, saj uporabimo najmanj 4 različne pozitivne kontrole) in interno pozitivno kontrolo (PPC).

Uporabili smo kvantitativno kinetično kromogeno metodo, ki je v Ph.Eur. predpisana kot metoda D (Kinetic – QCL test). Tip uporabljenega testa je »INHIBITION / ENHANCEMENT«, ki ima delno spremenjen encim, kateri se nahaja v optimalnem pH območju in ima dodane specifične soli ter divalentne katione. Vzorci lahko vplivajo na te optimalne pogoje v tako meri, da lizat ni več občutljiv na prisotnost endotoksina. Tako so lahko negativni rezultati testa tudi posledice inhibitornega delovanja sestavin vzorca na encim in ne odsotnosti endotoksina. S tem testom ugotavljamo, katera razredčitev vzorca preseže inhibicijo oziroma katalizo. Vsak vzorec ima dodano interno pozitivno kontrolo (PPC), s katero ugotavljamo inhibitorni vpliv vzorca na encim ($\pm 50\%$).

Pri dokazanem inhibitornem vplivu vzorca, moramo le-tega še bolj redčiti, da dobimo razredčitev, ki ni več inhibitorna.

1. Največja veljavna koncentracija (MVC):

$$MVC = \frac{\lambda M}{K}$$

Pri čemer je:

λnajnižja koncentracija standarda

M.....priporočen odmerek pri zdravilih

K.....najvišja dovoljena meja za endotoksin (0,5 EU/ml)

2. Največja dovoljena redčitev (MVD):

$$MVD = \frac{K}{\lambda}$$

3.3.5.1. Rezultati preizkušanja apirogenosti celičnih kultur in vsadkov

V procesu gojenja celičnih kultur matičnih celic in priprave celičnih nadomestkov vzorčimo v različnih stopnjah. Pogostnost vzorcev ter njihovo število je odvisno od specifičnih lastnosti priprave vsakega posameznega produkta.

Vzorčimo med samim procesom gojenja (vzorec gojišča K1, K2 in K3) ter tik po izdaji končnega pripravka naročniku (končna kontrola). V tem primeru upoštevamo priporočila Ph. Eur. za preskušanje bakterijskih endotoksinov v brizgah in ostalih vsebnikih. V vsebnike, v katerih so bili končni pripravki shranjeni več kot 20 ur, dodamo 5 mL fiziološke raztopine (Ph. Eur.) in inkubiramo 2 uri pri 37°C. Del raztopine vzorčimo (izpirek gojilnih posod).

Med procesom gojenja celic bakterijski endotoksini ne predstavljajo težav (koncentracija pod mejo detekcije). Pri vzorcu izpirka celic v nekateri primerih že zaznamo bakterijske endotoksini, prav tako pri vzorcih izpirkov gojilnih posod. Upoštevati moramo, da v zadnjih fazah priprave pripravkov, celicam dodajamo vse več sestavin, ki lahko doprinesejo v celokupni količini bakterijskih endotoksinov.

Volumni končnih pripravkov so bili med 13 in 54 mL. V skladu z zahtevami Ph. Eur. odrasel človek lahko v enkratnem odmerku prejme 350 EU. V naših primerih lahko bolnik v enkratnem odmerku prejme od 26,9 EU/mL do 6,5 EU/mL. Iz rezultatov je razvidno, da je količina bakterijskih endotoksinov v vseh primerih v dovoljenih mejah (preglednica 4). Pri vzpostavljenem načinu gojenja celičnih kultur ter priprave končnega produkta težav s prisotnostjo bakterijskih endotoksinov v celičnih kulturah nismo zaznali. Z zgoraj opisanim sistemom vzorčenja zagotovimo ustrezni nadzor celotnega postopka gojenja celic od začetka do konca.

Preglednica 4: Količina bakterijskih endotoksinov v različnih vzorcih.

	vzorec A	vzorec B	vzorec C	vzorec Č
procesna kontrola - gojenje celic	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
procesna kontrola - izpirek celic	≤ 0,5	0,5802	2,074	0,5393
	/	≤ 0,5	≤ 0,5	/
	/	≤ 0,5	≤ 0,5	/
	/	≤ 0,5	1,735	/
končna kontrola - izpirek gojilnih posod	/	≤ 0,5	0,7141	≤ 0,5

3.3.6. Kontrola postopka z vidika genetske istovetnosti

V procesu proizvodnje in kontrole kakovosti avtolognih celičnih in tkivnih pripravkov je s stališča varnosti bolnika pomembna zanesljiva identifikacija oziroma prepoznavanje celičnih kultur in končnih pripravkov glede na referenčni vzorec dajalca. Pri avtolognih pripravkih namreč ne pričakujemo zavrnitvene reakcije po vsaditvi kakor tudi ne možnosti prenosa nalezljivih bolezni, saj prejemniku (bolniku) vsadimo pripravek, pripravljen iz njegovih lastnih celic.

Najbolj zanesljiva metoda identifikacije biološkega materiala je metoda genetskega profiliranja, pri kateri določamo alelne vzorce (genetske profile). Pri mikrosatelitni oziroma fragmentni analizi tipiziramo mikrosatelite ali kratke tandemske ponovitve (lokuse STR), katere pomnožimo iz izolirane genomske DNA v verižni reakciji s polimerazo (reakcija PCR). Pomnožene lokuse STR nato ločimo s pomočjo kapilarne gelske elektroforeze.

V našem laboratoriju smo se odločili za uporabo reagenčnega sestava AmpFISTR® SGM Plus™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) – v nadaljevanju sestav AmpFISTR® SGM Plus™. Metoda fragmentne analize DNA s sestavo AmpFISTR® SGM Plus™ temelji na preiskavi mikrosatelitnih dolžinskih polimorfizmov molekule DNA. Pri preiskavi 10 lokusov STR ter dodatnega odseka amelogeninskega gena za določanje spola dobimo za vsakega posameznika edinstven vzorec alelov, ki je osebno specifičen in ga imenujemo genetski profil. Pri uporabi te metode dosegamo verjetnost ujemanja naključno izbrane osebe z genetskim profilom analiziranega biološkega vzorca 1 v 10^{15} . V primerjavi z velikostjo celotne človeške populacije (6×10^9) kaže ta verjetnost edinstvenost genetskih profilov. V analizo so zajeti vsi lokusi STR, katerih uporabo priporočata Interpol in CODIS (Combined DNA Index System) ter se uporabljajo v Evropi. Analizirani lokusi STR so: D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA ter odsek amelogeninskega gena. Pri reakciji PCR je v paru začetnih nukleotidov za posamezni lokus le en začetni nukleotid na 5' koncu označen s fluorescenčnim barvilom, kar omogoča detekcijo le enoverižnega produkta PCR in ne dvojnih vijačnic DNA, katere v zamreženem gelu med kapilarno gelsko elektroforezo zaradi večje molekulske mase potujejo počasneje. Ta fluorescenčna barvila so: 5-FAM, JOE, NED in ROX.

3.3.6.1. Postavitev metode

Za 50 μL reakcijo PCR proizvajalec priporoča uporabo od 1,0 do 2,5 ng DNA. Z umeritveno krivuljo DNA v območju od 480 do 0,8 ng smo ugotovili, da je za naše delo najbolj primerna uporaba 7 do 8 ng DNA oziroma koncentracija od 0,30 do 0,40 $\mu\text{g/mL}$. Koncentracij, višjih od 0,40 $\mu\text{g/mL}$, ne smemo uporabljati zaradi pojava prekrivanja fluorescence barvil, ko visok signal enega barvila povzroči dvig fluorescence in se tem lažno pozitivni signal pri drugem barvilu. Analiza je možna tudi pri koncentraciji DNA 0,10 $\mu\text{g/mL}$ (2 ng DNA), vendar za naše potrebe potrebujemo rezultat v roku nekaj dni (velikokrat v 48-ih urah), kar pomeni, da analize ni mogoče ponavljati. Zato raje uporabljamo večjo količino DNA in tvegamo pojav lažno pozitivnih rezultatov zaradi prekrivanja barvil kot neuspelo analizo. Pri primerjavi signalov vseh barvil lažno pozitivni rezultat lahko prepoznamo, saj se pojavi na istem mestu (ista velikost v bp) kot močan signal, ki ga je povzročil.

Reagenčni sestavi človeških identifikacijskih testov so eni najdražjih biološko-molekularnih reagentov in vsi uporabniki težimo k čim bolj racionalni porabi le-teh. Eden izmed načinov zmanjšanja porabe reagentov je zmanjšanje volumna reakcije PCR. Pri prvih analizah smo natančno upoštevali navodila proizvajalca za izvedbo reakcije PCR (50 μL). Glede na te podatke drugih laboratorijev smo se odločili uporabiti 15 μL reakcijo PCR, ki daje zanesljive in ponovljive rezultate. Istočasno smo zmanjšali tudi količino reagentov za denaturacijo produktov reakcije PCR (iz 25 μL na 12,5 μL). Pri hkratni izvedbi 50 in 15 μL reakcije PCR iz istih vzorcev smo dobili popolnoma ponovljive rezultate. Zato smo nadalje uporabljali 15 μL reakcijo PCR ter 12,5 μL mešanice za denaturacijo.

Analiziramo lahko le signale alelov, ki so med seboj dobro ločeni. Dobra ločljivost je še posebej pomembna pri signalih, ki ležijo zelo skupaj (razlika med njimi je manjša kot 1 bp). Avtomatsko vrednotenje velikosti alelov zahteva natančnost v območju $\pm 0,5$ bp glede na lestvico alelov. V kolikor je odstopanje previsoko, dobi alel oznako »OL Allele?«. Če ugotovimo, da je odstopanje v območju ± 1 bp, lahko alelu ročno pripišemo vrednost glede na lestvico alelov. V nasprotnem primeru moramo analizo ponoviti in hkrati preveriti nastavitve inštrumenta.

Optimalno območje intenzitete signalov genetskega analizatorja ABI PRISM 310 je med 150 in 4500 RFU. Pri prenosu metode na naš inštrument smo opazili, da pri intenzitetah, višjih od 2500 RFU pogosto prihaja do lažno pozitivnih rezultatov zaradi prekomernega prekrivanja fluorescence previsokih signalov. Glede na številne podatke iz literature ter rezultate vrednotenja mešanih kultur smo nastavili višino bazne linije na 50 RFU, upoštevamo pa signale, ki so višji od 100 RFU. V primeru ostrih signalov z intenziteto med 50 in 100 RFU moramo analizo ponoviti (najprej podaljšamo čas injiciranja vzorca v kapilaro, ponovno denaturiramo produkte PCR – pri tem uporabimo večjo količino produktov PCR, npr. 1,5 do 2 μL ; če to ne zadostuje ponovimo reakcijo PCR in če je potrebno tudi osamitev DNA).

3.3.6.2. Preskušanje vzorcev

Odločili smo se, da bomo primerjali referenčni vzorec (vzorec krvi, odvzet ob odvzemu krvi) z vzorcem končnega produkta. Pri vzorčenju končnega produkta smo imeli več možnosti:

- vzorčenje celic pred dodatkom osteogenega gojišča (t.j. diferenciacijsko osteogeno gojišče);
- vzorčenje celic iz osteogenega gojišča, tik pred nasaditvijo celic na nosilec;
- vzorčenje celic na nosilcu.

Pri postavitvi metode smo preskusili vse tri možnosti:

- vzorec krvi – A
- vzorec celic pred dodatkom osteogenega gojišča – B

- vzorec celic iz osteogenega gojišča, tik pred nasaditvijo celic na nosilec - C
- vzorec celic na nosilcu – Č

Za postavitev metode smo analizirali štiri različne vzorce. Ugotovili smo, da z izbrano metodo lahko analiziramo vse vzorce, razen vzorca celic na nosilcu (vzorec Č). Pri osamitvi DNA z nosilca se namreč med postopkom izolacije v vzorec izolirane DNA ekstrahirajo tudi sestavine nosilca, ki zavirajo reakcijo PCR. Pri pomnoževanju izbranih odsekov DNA tako ne dobimo zadostne količine produktov reakcije PCR in nadaljnja analiza s kapilarno gelsko elektroforezo ni mogoča.

Na osnovi rezultatov smo se odločili za naslednji sistem vzorčenja vzorcev za namen preskušanja genetske istovetnosti:

- vzorčenje krvi ob odvzemu večjega vzorca krvi za pripravo seruma – referenčni vzorec;
- vzorčenje celic pred dodatkom osteogenega gojišča - procesna kontrola;
- vzorčenje celic iz osteogenega gojišča, tik pred nasaditvijo celic na nosilec – končna kontrola.

Na ta način omogočimo analizo vseh vzorcev (primernost vzorcev za analizo) ter hkrati zagotovimo ustrezni nadzor celotnega postopka gojenja celic od začetka do konca. Namen preskušanja avtolognih celičnih in tkivnih pripravkov je izključitev zamenjave bioloških vzorcev dajalca. Zato je za prepoznavanje bioloških vzorcev glede na referenčni material pomembno popolno ujemanje njihovih genetskih profilov.

3.4. PRIDOBITEV POZITIVNEGA MNENJA KOMISIJE RS ZA MEDICINSKO ETIKO

Dne 19.9.2006, je bila študija »Vloga matičnih mezenhimske celice pri izpolnjevanju kostnih defektov na dolgih kosteh« na seji Komisije za medicinsko etiko ocenjena kot sprejemljiva. S tem je bilo pridobljeno soglasje Komisije za medicinsko etiko (številka 49/09/06) za izvajanje klinične študije.

3.5. UPORABA BIOLOŠKIH KOSTNIH NADOMESTKOV PRI PACIENTIH

Kirurški postopek aplikacije kostnega nadomestka z osteoblasti je podoben postopkom, kjer manjkajočo kost nadomeščajo z autografti, alografti oziroma kostnimi nadomestki. Razlika je materialu, s katerim zapolnjevamo defekt in v samem prenosu tkivno-inženirskega pripravka na želeno mesto. Najprej iz mesta defekta kosti odstranimo vezivno tkivo in tudi robne dele kosti, vse dokler ne dobimo vitalno, dobro prekrvljeno kost. Sledi fiksacija kosti s pomočjo osteosintetskega materiala. Po koncu fiksacije v defekt kosti vstavimo matične celice bolnika na nosilcu. Sledi zapiranje kirurške rane.

Po novem postopku so operirali 6 bolnikov. Način aplikacije kostnega nadomestka je opisan na primeru bolnika M.Z.. Bolnik M.Z. je 55-letni moški, ki je doživel prometno nesrečno pred 3 leti. Imel je zlom obeh stegnic. Na urgenci so mu vstavili v vsako stegnenico intramedularni žebelj. Leva stegnenica se je zacelila v 5 mesecih, na desni stegnenici pa je prišlo do pseudoartroze. Bolnik M.Z. je bil podvržen najprej klasičnemu postopku rekonstrukcije desne stegnenice (presaditev autologne spongiozne kosti), ki pa ni bil uspešen. Zato so mu kirurgi pri naslednjem posegu vstavili na mesto poškodbe kostni nadomestek, izdelan po našem protokolu – uporabili smo bolnikove mezenhimske matične

celice, ki smo jih izolirali iz kostnega mozga, jih diferencirali v kostne celice in jih nanесли na nosilec iz kalcijevega trifosfata. Na sliki 9 je prikazan način vstavitve kostnega nadomestka na mesto poškodbe kosti bolnika M.Z..



Slika 9: Prikaz načina aplikacije tkivno inženirskega kostnega nadomestka pri bolniku M.Z..

3.5.1. Optimizacija kirurške metode

Glede na to, da sta tako diagnoza kot tudi izvor defektov na dolgih kosteh različnih bolnikov različna, je skoraj pri vsakem bolniku potrebno v določeni meri spreminjati način fiksacije kosti (uporaba intramedularnih žebeljev – notranjih fiksaterjev, ploščic,...), način vstavljanja nadomestka na poškodovano mesto itd.

3.6. KLINIČNA ŠTUDIJA TER OVREDNOTENJE KLINIČNIH REZULTATOV

Z opisano metodo smo do sedaj zdravili 6 bolnikov. Vsi bolniki so imeli pred aplikacijo tkivno inženirskega nadomestka vsaj 2 klasična operativna postopka, s katerimi so jim poskušali pozdraviti komplicirane zlome dolgih cevastih kosti.

V spodnjem besedilu so predstavljeni klinični rezultati bolnikov, ki so bili zdravljeni s tkivno inženirskimi kostnimi nadomestki:

M.Z. 15.11.1955; poškodovan l. 2003 v prometni nezgodi, zlom stegenice. Število operacij pred uvedbo metode: 2. Velikost defekta: 1cm. Čas od zloma do uvedbe metode: 46 mesecev. Datum uvedbe metode 1.12.2006. Prvi znaki zaraščanja vidni po 7 mesecih. Polno obremenjuje okončino.

M.N. 28.1.1971; poškodovan 2006 v prometni nezgodi. Zlom goleni. Število operacij pred uvedbo metode: 4. Velikost defekta: 1-5 cm. Čas od zloma do uvedbe metode: 12 mesecev. Datum uvedbe metode 13.3.2007. Prvi znaki zaraščanja vidni po 6 mesecih. Delno obremenjuje okončino.

M.L. 19.6.1938; poškodovan l. 2003 v prometni nezgodi, zlom stegenice. Število operacij pred uvedbo metode: 3. Velikost defekta: 1 cm. Čas od zloma do uvedbe metode: 40 mesecev. Datum uvedbe metode 28.3.2007. Prvi znaki zaraščanja po 9 mesecih. Polno obremenjuje okončino.

J.D. 25.5.1957; poškodovan 9.1.2006 v prometni nezgodi, odprti zlom leve goleni. Število operacij pred uvedbo metode: 2. Velikost defekta: 1-3 cm. Čas od zloma do uvedbe metode:

16 mesecev. Datum uvedbe metode 8.5.2007. Brez znakov zaraščanja. Hoja brez obremenjevanja okončine.

I.D. 3.6.1979; poškodovana 20.10.1997 v prometni nezgodi, zlom desne stegnenice. Število operacij pred uvedbo metode: 7. Velikost defekta: 1cm. Čas od zloma do uvedbe metode: 120 mesecev. Datum uvedbe metode 7.11.2007. Prvi znaki kostnega preraščanja po 5 mesecih. Hoja z delnim obremenjevanjem.

A.Š. 27.3.1959; poškodovan 23.10.2006 v požaru, zlom goleni z opeklino. Število operacij pred uvedbo metode: 3. Velikost defekta: 3 cm. Čas od zloma do uvedbe metode: 14 mesecev. Datum uvedbe metode 20.12.2007. Brez znakov kostnega preraščanja. Hoja brez obremenjevanja.

Pri različnih bolnikih je potekalo celjenje kosti različno intenzivno. Pri bolniku M.Z. je bilo iz rentgenskih posnetkov razvidno, da so bili robovi granul nosilca zaobljeni, kar je bil prvi pokazatelj, da se do procesov regeneracije kosti. Na sliki 10 pa je rentgenski posnetek začetka celjenja poškodovane kosti pri bolniku M.Z. 6 mesecev po operaciji.



Slika 10: Rentgenski posnetek stegnenice bolnika M.Z. 6 mesecev po operaciji. Celjenje kosti se kaže v pojavu kostnega kalusa.

Iz navedenih podatkov sledi, da smo z opisanim tkivno inženirskim pristopom zdravljenja poškodb dolgih kosti v večini primerov uspeli spodbuditi celjenje kostnega tkiva. Pri dveh bolnikih je bil postopek zdravljenja uspešen in lahko polno obremenjujeta okončino. pri dveh bolnikih je opaženo uspešno preraščanje kostne mase in lahko delno obremenjujeta okončino, pri čemer lahko pričakujemo nadaljnje izboljšanje kliničnega statusa. Pri dveh bolnikih pa je prišlo nadaljnjih zapletov v postopku zdravljenja in so potrebni dodatni kirurški posegi. Pri tem je pomemben podatek, da je šlo v teh primerih za hude poškodbe okoliških/podpornih tkiv. Nadaljnje spremljanje bolnikov in klinična evalvacija je potrebna za natančnejšo analizo uspešnosti takega načina zdravljenja.

4. LITERATURA

Arosarena O. Tissue engineering. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005 Aug;13(4):233-41. Review.

Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol.* 1998;76(6):899-910. Review.

Blease R, Kanlic E. Management of open fractures. *Bosn J Basic Med Sci.* 2005 Nov;5(4):14-21. Review. PMID: 16351592 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature.* 2001 Nov 1;414(6859):118-21. Review.

Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science.* 1999 Jan 22;283(5401):534-7

Bruder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Oct;(367 Suppl):S68-83. Review.

Cheng SL, Zhang SF, Avioli LV. Expression of bone matrix proteins during dexamethasone-induced mineralization of human bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem.* 1996 May;61(2):182-93.

Zhu SJ, Choi BH, Huh JY, Jung JH, Kim BY, Lee SH. A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells, and periosteal cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Feb;101(2):164-9. Epub 2005 Sep 23.

Fleming JE Jr, Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am.* 2000 Jul;31(3):357-74. Review.

Frank O, Heim M, Jakob M, Barbero A, Schafer D, Bendik I, Dick W, Heberer M, Martin I. Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J Cell Biochem.* 2002;85(4):737-46.

Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science.* 2002 Feb 8;295(5557):1009-14. Review

Keating JF, Simpson AH, Robinson CM. The management of fractures with bone loss. *J Bone Joint Surg Br.* 2005 Feb;87(2):142-50. Review. No abstract available. PMID: 15736731 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science.* 1993 May;260(5110):920-6.

Lucarelli E, Donati D, Cenacchi A, Fornasari PM. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. *Transfus Apher Sci.* 2004 Apr;30(2):169-74. Review.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

Schimming R, Schmelzeisen R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Jun;62(6):724-9.

Turhani D, Cvikl B, Watzinger E, Weissenbock M, Yerit K, Thurnher D, Lauer G, Ewers R. In vitro growth and differentiation of osteoblast-like cells on hydroxyapatite ceramic granule calcified from red algae. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Jun;63(6):793-9.

Yazar S, Lin CH, Wei FC. One-stage reconstruction of composite bone and soft-tissue defects in traumatic lower extremities. *Plast Reconstr Surg.* 2004 Nov;114(6):1457-66. Review. PMID: 15509933 [PubMed - indexed for MEDLINE]