



DRUŠTVO ZA CELIČNO IN TKIVNO INŽENIRSTVO SLOVENIJE



BILTEN

**DGTIS SYMPOSIUM:
THE USE OF STEM CELLS
IN CARDIOVASCULAR AND ORTHOPAEDIC
TISSUE ENGINEERING:
BASIC RESEARCH AND STRATEGIES FOR
TRANSLATION INTO CLINICAL APPLICATIONS**

Maj 2007

Letnik 3, številka 3

U V O D N I K

Regenerativna medicina ima že več kot deset let v rokah močna orodja: od novih biomaterialov, bioreaktorjev do uporabe matičnih celic. Napredek je za nepoznavalca prepočasen, pričakovanja in razočaranja so včasih velika, toda nekaj je gotovo: pacientu lahko ponudimo boljše kvaliteto življenja, resnično zdravljenje vzroka bolezni in mnogo manj stranskih učinkov. Translacijsko raziskovanje, ko najnovejša znanstvena odkritja prevajamo v uspešne terapije, je ena glavnih točk novih EU okvirnih programov.

Slovenski kliniki in raziskovalci smo skupaj s svojimi partnerji po svetu relativno veliko prispevali k temu razvoju, saj je potrebno upoštevati naše naravne omejujoče dejavnike. Ambiciozno, pogumno in vztrajno moramo še naprej nadaljevati z delom, saj to niti ni se konec začetka, vsekakor pa ni začetek konca!

Skoraj dvesto bolnikov je bilo deležnih terapije z različnimi tkivno inženirskimi pripravki, še več jih je bilo vključenih v zdravljenje z uporabo matičnih celic. Predvidevamo, da bodo znanja o materialih, vodenju procesov, molekularni in sistemski biologiji, biologiji matičnih celic, fiziologiji, citologiji in seveda prilagajanje operativnih tehnik novim možnostim prineslo v naslednjih 10 do 15 letih velik napredek. Mi smo odločni, da bomo v vrhu teh procesov. Ta simpozij je že znak za to.

Doc. dr. Miomir Knežević, univ.dipl.biol.
Zavod RS za transfuzijsko medicino



Bilten Društva za celično in tkivno inženirstvo Slovenije

Maj 2007, Letnik 3: številka 3

Uredila: Nevenka Kregar Velikonja
Grafična podoba naslovnice: Zdenko Bračevac
Priprava in tisk: Educell d.o.o.

S I M P O Z I J

Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije organizira simpozij z naslovom:

"The use of stem cells in cardiovascular and orthopaedic tissue engineering: Basic research and strategies for translation into clinical applications"

Zavod RS za transfuzijsko medicino, 28.maj 2007 ob 10.00

Gostja simpozija je vrhunska strokovnjakinja s področja tkivnega inženirstva prof. Gordana Vunjak-Novaković (Columbia University, ZDA)

Program simpozija:

1. Gordana Vunjak Novakovic, Columbia University, USA: **"Advances in tissue engineering: new technologies, application to cardiovascular tissues "**
2. Darja Marolt, Columbia University, USA; Blood Transfusion Centre of Sloveia, SI: **"Controlling in vitro growth and differentiation of adult human stem cells for osteochondral tissue engineering"**
3. Nevenka Kregar Velikonja,: "Cartilage and bone tissue engineering applications: laboratory developments and clinical results. "
4. Saša Puhar, Educell d.o.o., SI: **"Quality requirements for development of tissue engineered product. "**
5. Dragoslav Domanovic, Blood Transfusion Centre of Sloveia, SI: **"Infusion of Autologous Periferal Blood Stem Cells into the heart vessels-preliminary results of the clinical trial"**
6. Dragica Smrke, Clinical Centre Ljubljana, SI: **"The use of platelet growth factors in the traumatology"**

POVZETKI / ABSTRACTS

Advances in tissue engineering: new technologies, application to cardiovascular tissues

Gordana Vunjak-Novakovic
Department of Biomedical Engineering,
Columbia University, New York NY USA

Tissue engineering offers a potential of developing new treatment options for the repair of injured myocardium, using functional tissues grown *in vitro*. Engineered tissues can also serve as physiologically relevant yet controllable models for studies of tissue development, remodeling and disease. Tissue engineering is largely an effort of "imitating nature" as it tends to recapitulate the aspects of the environment present *in vivo* during tissue development and thereby stimulate the cells to regenerate functional tissues. Based on these principles, a "biomimetic" approach has been established that involves the *in vitro* creation of immature but functional tissues by an integrated use of: *cells* (the actual

architects of a tissue), *biomaterial scaffolds* (a structural and logistic template for tissue development), and *bioreactors* (providing environmental control and biophysical regulation of the cells). Advanced technologies developed for tissue engineering of functional tissue grafts are now also being used for quantitative biological research, drug screening and many other applications that are important for regenerative medicine. This talk will review recent progress in the cultivation of cardiovascular tissue grafts, and the use of advanced scaffold and bioreactor technologies for studies of human stem cells. The main challenges of cardiovascular tissue engineering – establishment of a human cell source suitable for clinical use, development of vascular bed, and functional integration of engineered grafts – will be specifically addressed, as well as some of the research needs in the next 5-10 years.

Zapiski/notes:

Controlling *in vitro* growth and differentiation of adult human stem cells for osteochondral tissue engineering

Darja Marolt

Columbia University, Blood Transfusion
Centre of Slovenia

Tissue engineering (TE) could potentially provide an unlimited source of autologous tissue grafts for restoration of osseous, chondral and osteochondral defects. Large bone defects resulting from congenital malformations, injuries and diseases, as well as chondral and osteochondral defects could be treated by transplantation of TE grafts. The use of adult human stem cells offers several advantages, as these cells can differentiate and contribute to regeneration of different mesenchymal tissues, and are easily isolated and expanded *in vitro* while maintaining their multipotency. Based on previous work with dynamic culture systems and biocompatible scaffolding materials, we have studied several parameters that affect stem cell growth, differentiation and development of tissues *in vitro*. In our first study using rotating bioreactors, the choice of culture media supplements significantly

affected biochemical properties and morphology of the tissue constructs, with osteogenic medium yielding large, homogenous tissue constructs resembling human trabecular bone. In our second study, chondrogenic medium co-culture of bone- and cartilage-like constructs yielded integrated osteochondral composites with well developed bone-like phase, whereas chondrogenesis was limited in both studies. In order to study biophysical factors contributing to tissue development and regeneration, new dynamic culture systems are currently being developed, including a perfusion bioreactor system with on-line imaging capabilities, and microfluidic bioreactor systems for small-scale multiparametric studies of stem cell differentiation. Our longterm plans include the use of adult stem cells from different sources (bone marrow, adipose tissue), engineering of custom-shaped osteochondral grafts, vascularization of TE grafts and the use of human embryonic stem cells for osteochondral tissue engineering.

Zapiski/notes:

Cartilage and bone tissue engineering applications: laboratory developments and clinical results

Nevenka Kregar Velikonja, Ariana Barlič, Hana Krečič-Stres
Educell d.o.o., Ljubljana

The therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSC) is indisputably great, due to their ability to differentiate into different cell types. They have also been proposed as a source for cartilage and bone tissue engineering.

Cartilage and bone tissue engineering is based on exploitation of different cell sources: differentiated cells (chondrocytes, osteoblasts) can be efficiently proliferated for preparation of tissue engineered products of small volumes. Selection of cell source depends also on logistic of whole procedure. The diagnostics of cartilage defects is carried out arthroscopically, therefore biopsy can be obtained simultaneously. In the case of alveolar bone repair, it is also easier to get bioptic material from alveolar bone or periosteum than bone marrow. However, defects of long bones are sometimes voluminous, therefore large number of cells is needed for tissue engineered implant preparation. In such case, bone marrow derived stromal cells with osteogenic potential are appropriate cell source. In addition, adipose tissue is an attractive source of stem cells which could be easier available for different surgical applications (e.g. paradontology, oral surgery)

The development of **cartilage tissue engineering** is based on the usage of differentiated chondrocytes; the focus of this field is to prepare more defined product, which can be applied with less invasive surgical procedure (potentially arthroscopic), meaning faster recovery for the patients. Our current work is focused on the development of a product based on

autologous chondrocytes in agarose-alginate gel scaffold.

Bone tissue engineering for long bone defects is based on the exploitation of bone marrow derived stromal cells (BMSC). In Educell d.o.o. a project was started last year in which the efficiency of the treatment of long bone defects by implantation of autologous tissue-engineered bone grafts, prepared from patient's BMSC derived osteoblasts seeded on the calcium-triphosphate scaffold, is going to be evaluated. Preliminary results with the first four patients (including: successful cell culture, cell differentiation and graft preparation, complication-free graft implantation, and indications of successful bone healing) show promise that our approach will result in substantial improvement in long bones defects treatment.

The **characterization of cell populations isolated from bone marrow** (bone marrow derived stromal cells - BMSC) in order to obtain MSCs is a major issue. Investigation of the differentiation potential and phenotypic characteristics of BMSC's is a necessary preliminary step that will enable their therapeutic potential to be exploited. We have studied proliferation and differentiation potential of bone marrow derived mesenchymal cells. The population of BMSC was studied by investigating its colony forming capacity (CFC) and its ability to express chondrogenic, osteogenic and adipogenic phenotypes. In our experiments, BMSCs grown in monolayer cultures maintained the CFC of up to 10% of the cells from the previous passage. Chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation of the cells was achieved, however their capacity for osteogenic or adipogenic differentiation was limited to up to 20% of the cells.

Tkivno inženirstvo hrustančnih in kostnih vsadkov: razvoj in klinični rezultati

Nevenka Kregar Velikonja, Ariana Barlič, Hana Krečič-Stres
Educell d.o.o., Ljubljana

Terapevtski potencial mezenhonskih zarodnih celic je nedvomno velik, saj so se le te sposobne diferencirati v različne tipe celic. Med drugim so tudi primeren vir celic za tkivno inženirstvo hrustanca in kosti.

Tkivno-inženirske nadomestke hrustanca in kosti lahko pripravljamo iz diferenciranih celic (osteoblasti, hondrociti) ali iz različnih vrst zarodnih celic. Izbira vira celic je odvisna od logistike celotnega postopka. Diagnostika hrustančnih poškodb se običajno izvaja srtrioskopsko, kar omogoča enostaven sočasni odvzem hrustančnega biopta. V primeru zdravljenja poškodb paradontalne kosti je biopt alveolarne kosti ali periosta lažje dostopen kot kostni mozeg. Pri poškodbah dolgih kosti pa so večinoma potrebni veliki volumni tkivno inženirskega nadomestka in v tem primeru so MSC iz kostnega mozga najprimernejši vir celic. Kot vir MSC je zanimivo tudi maščobno tkivo, ki je pri nekaterih kirurških postopkih lažje dostopno (npr. v paradontologiji, oralni kirurgiji).

Razvoj tkivno inženirskih hrustančnih nadomestkov temelji na gojenju diferenciranih hondrocitov. Razvoj vodimo v smeri priprave bolj definiranih produktov(npr. v smislu števila in kakovosti celic), ki bi hkrati omogočal čim manj invaziven kirurški poseg. Trenutno

razvijamo produkt na osnovi avtoloških hondrocitov v agarozno-alginatnem gelu.

Tkivno-inženirske kostne nadomestke pripravljamo na osnovi stromalnih celic kostnega mozga (BMSC). Educell vodi projekt, v katerem preizkušamo učinkovitost zdravljenja poškodb dolgih kosti z vsadki iz avtoloških gojenih BMSC na nosilcu iz kalcijevega trifosfata. Rezultati pri prvih štirih bolnikih (uspešno gojenje in diferenciacija celic, priprava vsadka, implantacija in kooperativni znaki uspešnega celjenja) nakazujejo, da bo tak pristop lahko znatno pripomogel k uspešnejšemu celjenju poškodb dolgih kosti.

Opredelitev populacije celic, ki jih izoliramo iz kostnega mozga (BMSC) in iz katere želimo dobiti mezenhonske zarodne celice je en pomembnejših vidikov tkivnega inženirstva produktov, ki temeljijo na uporabi teh celic. Raziskave diferencijskega potenciala in drugih značilnosti BMSC so nujno potrebne, če želimo opredeliti in izkoristiti njihov potencial za zdravljenje različnih kliničnih indikacij. Pri BMSC smo preiskovali njihovo sposobnost tvorbe kolonij in sposobnost izražanja osteogenega, hondrogenega in adipogenega fenotipa. Sposobnost tvorbe kolonij smo ugotovili pri največ 10% celic v celični kulturi BMSC. Pri celicah smo dokazali sposobnost diferenciacije v vse tri tipe celic, vendar smo znake osteogene in adipogene diferenciacije ugotovili pri največ 20% celic.

Quality requirements for development of tissue engineered product

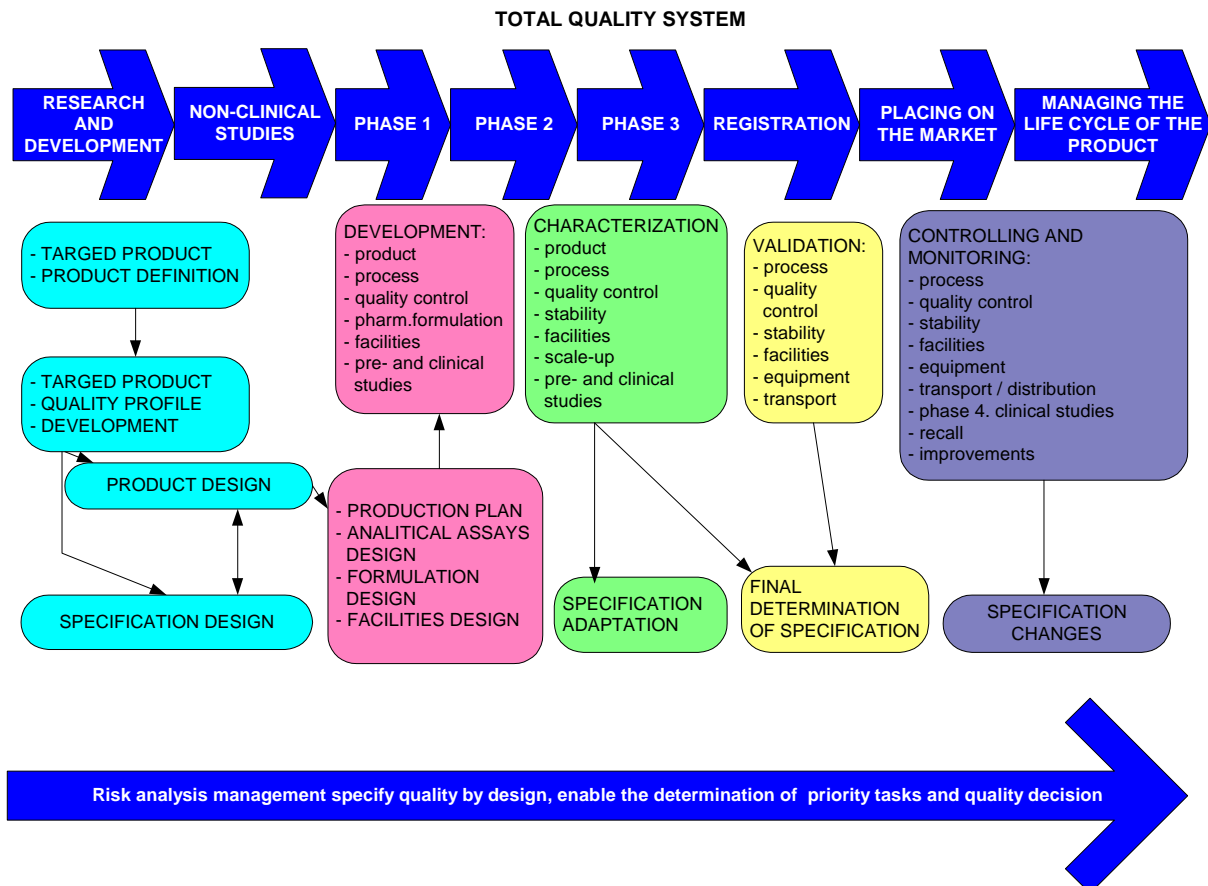
Saša Puhar

Educell d.o.o., Ljubljana

The manufacturing of tissue engineered products is more complex, complicated and long-term process in comparison with the classical medical products. It is important to precisely control all research and development phases by specified standard operating procedures. All the

parameters (techniques, methods, equipments, facilities, production environment) should be precisely validated.

In the year 2006 a new concept “quality by design” in the development and manufacturing of the biological products was brought forward. It is very important to include all essential elements in the development plan of a new product:



The “good practise” system is well established in the field of the medical products production. Good laboratory practice (GLP) is a quality system concerned with the organisation process and the conditions under which non-clinical health and environment safety studies are planned, performed, monitored, recorded, archived and reported. The GLP and GMP (good manufacturing practice) requirements are very similar in the many areas (GMP is a quality system concerned

with the manufacturing of the medical products, irrespective of phase of clinical studies), therefore it not reasonable to make differences between GLP and GMP.

GLP principles are:

1. organisation and personnel (qualifications, experiences, training);
2. documentation: documented process and its results;
3. suitable facilities;

4. record keeping with the evidence of reliable raw data.

GLP principles determinate **who, what** and **how** should work and could **prove** it.

Development studies are less demanding, concerning the documentation system (only the hypothesis is documented, not the whole protocols), nevertheless the traceability of the development phases and the decision milestone should be assured. The reliability of work and results should be demonstrated thoroughly. GLP study without documentation, method and

facilities validation does not exist and it is not useful for the following studies.

The application of the new therapies (e.g. tissue and cell therapies) brings the lack of long-term clinical experience and the understanding of the mechanisms of acting. The competent authorities do not have experiences, especially about safety of the new products, therefore the legislation of the biological products are more and more strictness. For that reasons it is very important to consider the principles of good practices, which ensure the safety, quality and effectiveness of tissue and cell based products.

Kakovostne zahteve za razvoj tkivno inženirskih izdelkov

Saša Puhar
Educell d.o.o., Ljubljana

Izdelava tkivno inženirskih izdelkov je v primerjavi s klasičnim zdravilom velik bolj zapletena, zahtevna in dolgotrajna. Pomembno je, da so vse stopnje razvoja natančno kvalitativno ter kvantitativno nadzorovane s predpisanim standardnimi operacijskimi postopki. Vsi parametri, od tehnik, aparatur, sistemov ter proizvodnega okolja pa morajo biti natančno validirani.

V letu 2006 se je v proizvodnji in načrtovanju bioloških zdravil uveljavilo načelo »kakovosti zdravila z načrtovanjem«. Izjemno pomembno je, da v samem začetku načrtovanja novega izdelka v razvojni načrt vključimo vse bistvene elemente:

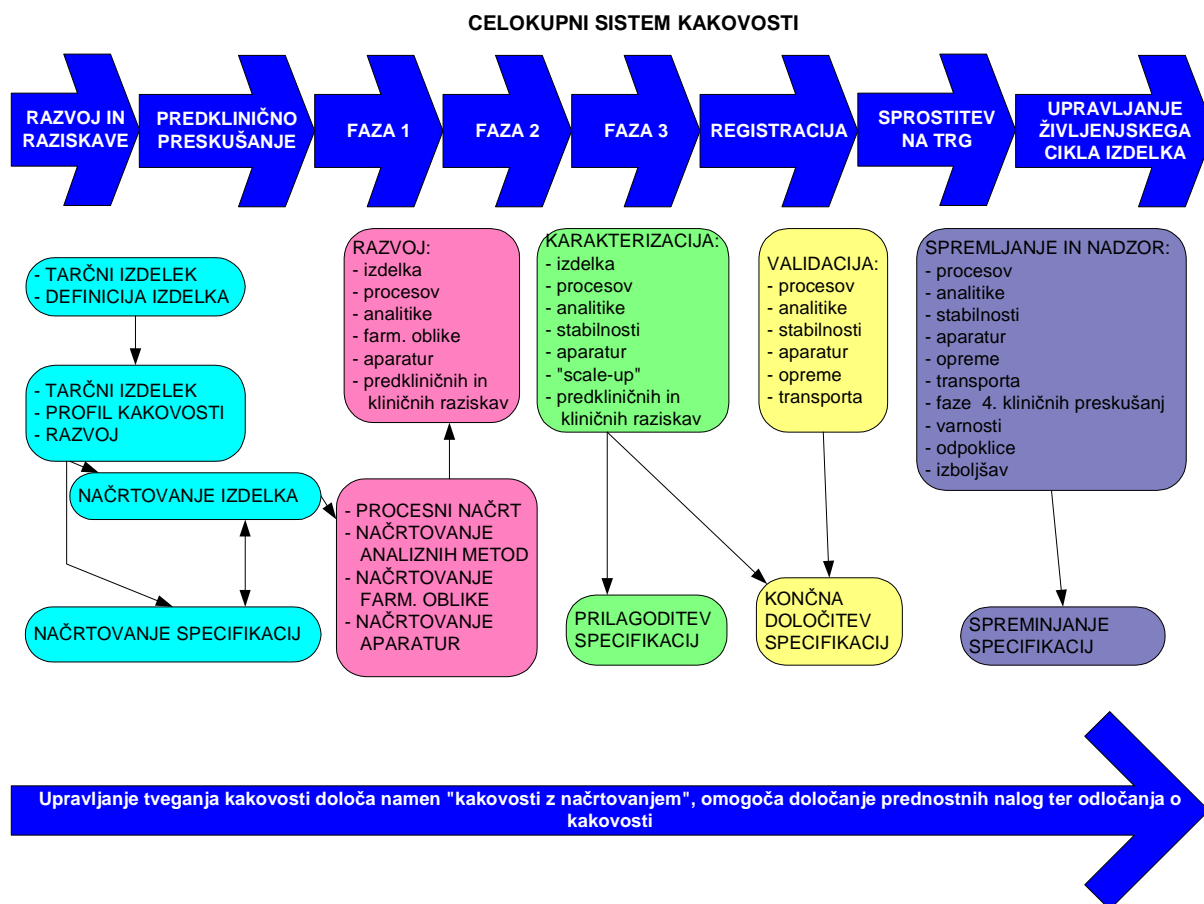
Na področju izdelave zdravil je uveljavljen sistem dobrih praks. Dobra laboratorijska praksa (DLP, angl. GLP) je definirana kot sistem kakovosti, ki se nanaša na organizacijske postopke in pogoje, v katerih se neklinične zdravstvene in

okoljske varnostne študije načrtujejo, izvajajo, nadzorujejo, zapisujejo, arhivirajo in se o njih poročajo. Zahteve GLP in GMP (dobra proizvodna praksa) so si podobne oziroma enake na mnogih področjih (GMP je sistem kakovosti proizvodnje izdelkov za humano rabo, ne glede na stopnjo kliničnega testiranja), zato v teh primerih ni smiselno razlikovati med GLP in GMP.

Osnovne zahteve GLP so:

1. organiziranost in primerni izvajalci (izobrazba, usposobljenost, redno izobraževanje);
2. dokumentiranost: dokumentirani proces in dokumentirani rezultati procesa;
3. ustrezna oprema;
4. arhivirani podatki z dokazi o verodostojnosti študije.

Načela GLP določajo kdo, kaj in na kakšen način lahko dela in vse to lahko tudi dokaže.



Razvojne študije so dokumentacijsko manj zahtevne (ne moremo napisati celotnega protokola, le hipoteze), vendar moramo zagotavljati sledljivost razvojnih korakov in odločitev. Dopusčena je relativno visoka stopnja kreativne svobode, a postopki in rezultati morajo biti dokumentirani, saj služijo kasnejši klinični študiji, validaciji oziroma registracijskem postopku. Vsak trenutek moramo biti spodobni dokazati verodostojnost dela in rezultatov. GLP študija brez validacij metod, opreme in dokumentacije ne obstaja oziroma ni uporabna za nadaljnje delo.

Zavedati se moramo, da pri novih načinih zdravljenja (kamor zagotovo sodi tkivno inženirstvo) še ne poznamo mehanizmov delovanja oziroma dolgoročnih posledic uporabe tovrstnega zdravljenja. Tudi regulatorni organi nimajo predhodnih izkušenj – zlasti, ko gre za zagotavljanje dokazov o varnosti – zato se regulativa bioloških izdelkov za humano uporabo stalno zaostrojuje. Tako je še toliko bolj pomembno, da v vseh fazah razvojnega procesa tkivno inženirskih izdelkov upoštevamo načela dobrih praks, katerih osnovni namen je zagotavljanje varnosti, kakovosti in učinkovitosti teh izdelkov.

Zapiski/notes:

Presaditev avtolognih krvotvornih matičnih celic v srce bolnikov z napređovalim srčnim popuščanjem

(Infusion of Autologous Periferal Blood Stem Cells into the heart vessels- preliminary results of the clinical trial)

Dragoslav Domanovič¹, Matjaž Sever²,
Bojan Vrtovec³, Luka Ležaič⁴, Jure
Fettich⁴, Peter Černelc²

¹ Zavod RS za transfuzijsko medicino,

² KO za hematologijo, KC Ljubljana

³ KO za kardiologijo, KC Ljubljana

⁴ Klinika za nuklearno medicino, KC

Povzetek

Srčne mišične celice imajo ob poškodbi omejeno sposobnost obnavljanja, kar pripelje do zmanjšane krčljivosti srčne mišice in srčnega popuščanja pri bolnikih. Krvotvorne matične celice (KMC) imajo nasprotno zelo veliko sposobnost obnavljanja in razvijanja v različne tipe somatičnih celic. Pri sedmih bolnikih z napređovalim srčnim popuščanjem neishemičnega vzroka smo stimulirali kostni mozeg s filgrastimom ter nato opravili citaferozo in imunomagnetno selekcijo zbranih enojedrnih celic. Pridobili smo raztopino KMC, ki smo jo s kateterizacijo srca vbrizgali v izbrano venčno arterijo na podlagi funkcijske ocene nuklearnomedicinskih preiskav. Pri vseh bolnikih je en mesec po presaditvi KMC prišlo do bistvenega izboljšanja kliničnega stanja, zmanjšanja plazemskih vrednosti pro-B natriuretičnega peptida, izboljšanja iztisnega deleža levega prekata in skrajšanja intervala QTc na visokoločljivem EKG posnetku.

Ključne besede: srčno popuščanje, krvotvorne matične celice, zdravljenje.

1. Učinki matičnih celic na srčno mišico

Sposobnost obnavljanja srčnih mišičnih celic je zelo omejena, zato poškodbe miocitov (ishemična bolezen srca, virusna okužba, imunska neravnovesje) pogosto

vodijo do nepopravljivih poškodb srčne mišice [1]. Pri bolnikih z napređovalim srčnim popuščanjem je krčljivost srčne mišice zmanjšana zaradi odmiranja miocitov in močno okrnjenega delovanja preostalih še delujočih srčnih mišičnih celic. V nasprotju z miociti imajo krvotvorne matične celice (KMC) zelo veliko sposobnost obnavljanja in razvijanja v različne tipe somatičnih celic. Ugodni učinki presaditve matičnih celic v srčno mišico temeljijo na spreminjanju v specialne celice, razvoju ožilja in izločanju hormonov.

2. Spodbujanje kostnega mozga in zbiranje KMC

Pri presajanju uporabljamo pretežno KMC iz periferne krvi. Za njihovo zadostno količino v periferni krvi vzpodbujamo kostni mozeg s filgrastimom, ki je rekombinantni dejavnik za pospešitev nastanka in dozorevanja granulocitov (G-CSF) [2], v odmerku 5 µg/kg telesne mase dvakrat na dan. Postopek je relativno varen z blagimi neželenimi pojavi kot so bolečine v kosteh, glavobol, utrujenost, slabost. Življenjsko ogrožujoči zapleti so izredno redki [3]. Vzpodbuditev običajno poteka štiri dni. Peti dan je raven KMC v periferni krvi tudi do štiridesetkrat večja od začetne [4]. Njihovo število ocenjujemo s pretočnim citometrom posredno preko določanja celic CD34+, ki se ob vzpodbujanju prav tako sprostijo iz kostnega mozga in so v krvi prisotne v večjem številu. Zato se za zbiranje odločamo na podlagi števila celic CD34+ v krvi. KMC iz periferne krvi zbiramo s citaferozo. Pri tem postopku odvzamemo periferno vensko kri iz telesa, ji dodamo antikoagulantno sredstvo in jo s centrifugiranjem ločimo v sestavine. Nato

želeno sestavino krvi obdržimo, ostale pa vrnemo nazaj v telo [5]. Na ta način pridobimo enojedrne celice iz krvi. Pretok krvi med posegom je 30-80 ml/min. Z odvzemom matičnih celic iz 1,5-2-kratnega kostnega volumna krvi zberemo do 80 % celic CD34+ v krvnem obtoku [6]. Tudi citafereza je varen postopek. Najpogostejši neželeni pojavi so hipokalcemija zaradi uporabe citrata in zamašitev venskega pristopa. Ko s citaferezo enojedrne celice zberemo, jih z aparatom za imunomagnetno selekcijo celic (npr. Isolex 300i) očistimo preostalih celic, ki jih ne potrebujemo [7]. S tem postopkom postopno pridobimo raztopino celic CD34+, ki se lahko vbrizga v venčne arterije.

3. Nuklearnomedicinske preiskave pri presaditvi KMC v srce

Nuklearnomedicinske metode omogočajo funkcijsko oceno stanja srčne mišice, kar uporabljamo pred presaditvijo KMC pri načrtovanju posega, po presaditvi pa pri sledenju uspešnosti zdravljenja, medtem ko z označevanjem KMC ocenjujemo akutno uspešnost posega na podlagi razporeditve in deleža presajenih KMC v srčni mišici. Pred presaditvijo KMC potrebujemo oceno življenjske sposobnosti (viabilnosti) srčne mišice. Oceno opravimo s perfuzijsko scintigrafijo srčne mišice z metodo elektrokardiogramsko sprožene enofotonske emisijske tomografije (GSPECT) [1], pri kateri uporabljamo talij (^{201}Tl) ali tehnecijeve izotope ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ sestamibi). Razporeditev presajenih KMC v srcu in drugje po telesu spremljamo, če jih označimo z radioaktivnim izotopom $^{99\text{m}}\text{Tc}$ hidrosimetilpropilenaminoksim (HMPAO) ali ^{111}In oksin, v zadnjem času tudi ^{18}F FDG [8]. Scintigrafski posnetki nam omogočijo oceno razporeditve presajenih KMC v srcu in izračunanje deleža celic, ki ostanejo v srčni mišici, saj se preostale celice kopičijo v retikuloendoteltnem sistemu jeter, vranice in kostnega mozga.

4. Tehnike presaditve matičnih celic

Za presaditev KMC je na voljo več metod, katerih cilj je doseči čim večje zadrževanje celic v srčni mišici. V zadnjem času se največ uporabljata vbrizganje v venčne arterije in skozi endokard.

Pri vbrizganju v venčno arterijo po standardnem femoralnem pristopu namestijo v venčno arterijo kateter, po katerem v časovnih presledkih vbrizgajo KMC. V nekaterih laboratorijih med vbrizgavanjem celic tudi napihnejo balon za mestom vbrizganja, da s tem povečajo učinkovitost zadrževanja celic v srčni mišici [9].

Pri bolnikih z neprehodnimi venčnimi arterijami je možno KMC presaditi skozi endokard [10]. Pri tej tehniki uvedemo injekcijski kateter po standardnem femoralnem pristopu v votlino levega prekata. S pomočjo elektromehanskega označevanja (»mappinga«) določimo ciljna mesta, kamor nato skozi endokard po injekcijskem katetru neposredno vbrizgamo KMC [11].

5. Presaditev matičnih celic v Sloveniji

Od maja 2006 smo v Kliničnem centru v Ljubljani opravili presaditev avtolognih KMC pri sedmih bolnikih z napredovalim srčnim popuščanjem neishemičnega vzroka, ki so bili uvrščeni na listo čakajočih za presaditev srca.

Bolnike smo na zbiranje perifernih KMC iz krvi s selektivno citaferezo pripravili z rastnim dejavnikom granulocitne vrste – G-CSF (filgrastim). Peti dan po začetku priprave z G-CSF-om smo opravili zbiranje enojedrnih celic z levkocitaferezami. Dan po končani levkoferezi smo opravili kateterizacijo srca in koronarografijo ter v venčno arterijo vbrizgali raztopino celic CD34+, katere smo predhodno osamili iz pripravka enojedrnih celic. Bolnike smo 24 ur po posegu opazovali v enoti za intenzivno zdravljenje in jih čez 48 ur odpustili domov.

Pri vseh bolnikih je en mesec po presaditvi KMC prišlo do bistvenega izboljšanja

kliničnega stanja (ocenjeno z lestvico NYHA in šest minutnim testom hoje), zmanjšanja plazemskih vrednosti pro-B natriuretičnega peptida, izboljšanja iztisnega deleža levega prekata in skrajšanja intervala QTc na visokoločljivem EKG posnetku.

Na podlagi opisanih rezultatov lahko sklepamo, da je presaditev KMC relativno varen postopek, s katerim lahko izboljšamo klinično stanje, krčljivost in elektrofiziološke lastnosti levega prekata pri bolnikih z napredovalim srčnim popuščanjem.

Literatura

1. Young JB. Refractory heart failure. *Curr Cardiol Rep* 1999;1:67-81.
2. Duerhsen U, Villeval J-L, Boyd J et al. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 1988;72: 2074.
3. Anderlini P, Przepiorka D, Seong D et al. Clinical toxicity and laboratory effects of granulocyte-colony-stimulating factor (filgrastim) mobilisation and blood stem cell apheresis from normal donors, analysis of charges for the procedure. *Transfusion* 1996;36:590.
4. Lane TA, Law P, Maruyama M et al. Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilised into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogenic marrow transplantation. *Blood* 1995;85:275.
5. Burgstaler EA: Current instrumentation for apheresis. In McLeod BC, Price TH, Drew MJ (eds): *Apheresis: principles and practice*. Bethesda, MD, AABB Press, 1997, 85.
6. McCullough J, Chopek M. Therapeutic plasma exchange. *Lab Med* 1981;12:754.
7. Hildebrandt M, Serke S, Meyer O et al. Immunomagnetic selection of CD34+ cells: factors influencing component purity and yield. *Transfusion* 2000;40:507.
8. Boerman OC, Rennen H, Oyen WJ, Corstens FH. Radiopharmaceuticals to image infection and inflammation. *Semin Nucl Med* 2001;31(4):286-95.
9. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141-8.
10. Esparcotte R, Vaughn WK, Dohmann HFR et al. One-year follow-up of transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(5):864-2.
11. Silva GV, Perin EC, Assad JA et al. Transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells may enhance myocardial viability around cell injection site. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(5):814-1.

Zapiski/notes:

Uporaba trombocitnih rastnih dejavnikov v travmatologiji

(The use of platelet growth factors in the traumatology)

Dragica Maja Smrke¹, Borut Gubina¹,
Dragan Domanovič², Zoran Bolta², Primož
Rožman²

¹ Klinični Center, Ljubljana,

² Zavod RS za transfuzijsko medicino

Kostni presadki se uporabljajo v travmatologiji v namen celjenja defektov kosti. Metoda za rekonstrukcijo kostnih defektov, ki prinaša najboljše rezultate, je uporaba avtolognih kostnih presadkov, odvzetih iz medenice. Ker avtologni presadki pogosto niso na voljo, so v zadnjih 50 letih uspešno uporabljali tudi alogenske kostne presadke iz kostne banke, v zadnjem času pa tudi sintetične kostne nadomestke, npr. demineraliziran kostni matriks, keramiko in sestavljene vsadke. Idealen kostni nadomestek mora imeti osteogenetski potencial, biti mora biokompatibilen, bioabsorbilen in mora služiti kot ogrodje za novo nastalo kost. Moderni pristopi k zdravljenju poškodb z učvrstitvijo zlomov so načeloma uspešni, vendar se v primeru okužbe kosti lahko razvije psevdartroza. Klasične metode zdravljenja so bile povezane z dolgotrajnim zdravljenjem, dolgotrajno hospitalizacijo, kronično bolečino, s številnimi komplikacijami ter s ponavljajočimi se operacijskimi posegi. Zdravljenje se sestoji običajno v stabilizaciji kostnega defekta z zunanjim fiksatorjem ali z notranjo učvrstitvijo in z avtolognim kostnim presadkom, običajno odvzetim iz medenice.

Že dalj časa poročajo o uporabi rastnih faktorjev v obliki avtolognega ali alogenskega trombocitnega gela v kombinaciji z avtolognim kostnim presadkom. Učinek pospešenega celjenja psevdartroze je v tem primeru pripisan različnim rastnim faktorjem, ki se po

aktivaciji s kalcijem ali trombinom sprostijo iz trombocitov. Ti delujejo stimulatorno na različne matične celice v kosti, ki se spremenijo v progenitorje in nato v osteoblaste, fibroblaste in druge celice kosti, pri čemer pospešijo tvorjenje kalusa. Kostni transplantat lahko deluje tudi kot matrica v katero prodirajo nove žile in bolnikove lastne celice, hkrati pa deluje tudi kot makroskopski model za nastalo novo kost.

V okviru raziskovalnega projekta pri Ministrstvu za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo smo razvili novo metodo zdravljenja pri bolnikih s kostnim defektom na dolgih cevastih kosteh. S pravilno koncentracijo koncentriranih in obsevanih alogenskih trombocitov v kombinaciji s trombinom in kalcijevim kloridom smo z dodatkom na roko zdrobljene spongiozne kosti odvzete iz medenice dobili čvrsto obliko alogenskega trombocitnega gela, ki se ga je dalo oblikovati glede na obliko kostnega defekta. Alogenski trombocitni gel je zgoščen preparat alogenskih trombocitov v majhnem volumnu z visoko koncentracijo rastnih faktorjev, predvsem PGF- β in PDG-F, ki imajo močne osteoinduktivne lastnosti pri zdravljenju zlomov.

Ugotavljali smo učinkovitost zdravljenja večjih kostnih defektov dolgih kosti (femurja in tibije) pri petih (5) bolnikih, ki so bili predhodno že večkrat operirani in jim vsi do tedaj uporabljeni kirurški postopki niso zagotovili kostnega preraščanja. Vsi bolniki so imeli predhodno tudi okužbo v predelu zloma (akutni ali kronični osteitis), ki je bila sanirana. Prav tako so vsi bolniki ob poškodbi utrpeli tudi precejšnjo okvaro mehkih tkiv. Nekateri so imeli predhodno prisotne spremljajoče bolezenske

spremembe kot je to diabetes, ki tudi lahko zaviralno vpliva na celjenje kosti.

Postopek aplikacije alogenskega trombocitnega gela z avtolognim kostnim presadkom je bil izvršen na ustaljen operacijski način. Pri operaciji je bila najprej osvežena psevdartroza oziroma kostni defekt, odstranjeno je bilo fibrozno tkivo in pripravljeno ležišče za kostni presadek. Alogenski trombociti so bili predhodno obsevani in filtrirani zaradi odstranitve levkocitov. Pripravili smo gel, v katerem smo aktivirali trombocite iz standardnega trombocitnega preparata iz krvne banke, dodali odvzeto spongiozno kost, vsadek smo oblikovali ter ga vložili v kostni defekt. Psevdartrozo smo v 3 primerih imobilizirali z zunanjim fiksatorjem, v enem primeru smo uporabili notranjo osteosintezo z DHS vijakom in dolgo ploščo, v enem primeru pa je bila aplicirana plastična tutor ortoza, ker je bil bolnik preobčutljiv na osteosintezni material, po katerem se mu je po številnih predhodnih operacijah pojavljalo vnetje.

Po 3 do 4 mesecih po izvršeni operaciji smo naredili CT slikanje z rekonstrukcijo, ki je natančneje pokazal obseg celjenja. Rentgensko diagnostiko smo ponovili še pri devetih mesecih po izvršeni operaciji. Izvajali smo tudi kontrolo imunskega odziva na alogenske trombocite, ki je bila v vseh primerih negativna. Preliminarni rezultati so pri zdravljenih skupno 5 bolnikih v 3 primerih pokazali dobro celjenje in zacelitev kostnega defekta v pričakovanem času. V 2 primerih se je po načrtovani opazovalni dobi ponovno pojavila psevdartroza oziroma zdravljenje ni bilo uspešno. Razlog za to bi lahko bil v nestabilnosti zunanje fiksacije, prezgodnjem polnem obremenjevanju poškodovanega spodnjega uda in v nesledenju bolnika navodilom zdravnika.

V primeru zdravljenja bolnikov s kostnim defektom na dolgi cevasti kosti smo tako kot prvi poročali o uporabi alogenskega trombocitnega gela v kombinaciji z avtolognim kostnim presadkom. Prednost te metode je v enostavni pridobitvi alogenskih trombocitov, ki so na razpolago v večjih količinah in s tem tudi veliko količino rastnih faktorjev, ki so varni in predstavljajo alternativo avtolognim trombocitnim pripravkom. Dodatek rastnih faktorjev v obliki alogenskega trombocitnega gela k avtologni spongiozni kosti je enostavna in varna metoda, ki obeta dobre klinične rezultate pri zdravljenju kostnih defektov.

Literatura

1. Smrke D, Arnez ZM. Treatment of extensive bone and soft tissue defects of the lower limb by traction and free-flap transfer. *Injury* 2000; 31:153-62.
2. Franchini M, Dupplicato P, Ferro I, De Girooncoli M, Aldegheri R. Efficacy of platelet gel in reconstructive bone surgery, *Orthopedics* 2005; 28:161-3.
3. Frechette JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent. Res.* 2005; 84:434-9.
4. Borzini P, Mazzucco L. Tissue regeneration and in loco administration of platelet derivatives: clinical outcome, heterogeneous products, and heterogeneity of the effector mechanisms. *Transfusion* 2005; 45:1759-67.
5. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis—a preliminary result of three cases. *Bone* 2004; 35:892-8.
6. Rughetti A, Flamini S, Colafarina O, et al. Closed surgery: autologous platelet gel for the treatment of pseudoarthrosis. *Blood Transfus* 2004; 37-43.
7. Smrke D., Gubina B., Domanovič D., Rozman P.: Allogeneic platelet gel with autologous cancellous bone graft for the treatment of a large bone defect. *Eur. Surg. Research*, in print.

Aktivnosti društva

Občni zbor društva DCTIS, 23.3.2007

Zapisnik Občnega zbora Društva za celično in tkivno inženirstvo Slovenije

Čas: petek, 23.3.2007 ob 13h

Kraj: predavalnica Ortopedske klinike KC Ljubljana, Šljajmerjeva 9.

Število udeležencev: 19

Ker je bilo prisotnih manj kot polovica rednih članov, so bila najprej na vrsti predavanja, ob 14.05 pa smo začeli s formalnimi točkami dnevnega reda.

Predstavljeni sta bili predavanji:

Dr. Primož Rožman: Predstavitev PREDLOGA ZAKONA O KAKOVOSTI IN VARNOSTI ČLOVEŠKIH TKIV IN CELIC, NAMENJENIH ZA ZDRAVLJENJE, ki je v pripravi.

Prof.dr. Matjaž Rode: AVTOLOGNI TKIVNO-INŽENIRSKI NADOMESTKI ZA ZDRAVLJENJE OBOLELE ALVEOLARNE KOSTI

Dnevni red občnega zbora:

1. Poročilo o delovanju društva (Predsednik društva dr. Damjan Radosavljevič)

Društvo ima 43 rednih članov.

Doslej je društvo sodelovalo pri organizaciji 3. Cartilage weekenda in organiziralo še 5 strokovnih srečanj s predavanji. Izdana sta bila dva biltena, kjer so bili med drugim zbrani povzetki predavanj. Ob 10-letnici je društvo podelilo priznanje za uvajanje dosežkov tkivnega inženirstva v klinično prakso prim. Damjanu Radosavljeviču in doc. Dr. Matjažu Jerasu.

Društvo je sofinanciralo udeležbe na stokovnih izobraževanjih trem svojim članom.

Monografija s prispevki s 3. Cartilage weekenda je v pripravi in bo predana v recenzijo predvidoma v aprilu.

Občni zbor je soglasno potrdil poročilo o delovanju društva.

2. Finančno poročilo (Blagajnik društva dr. Branko Koritnik)

Občni zbor je soglasno potrdil finančno poročilo.

3. potrditev imenovanja članov upravnega in nadzornega odbora društva

Občni zbor je soglasno potrdil naslednje člane upravnega in nadzornega odbora:

Upravni odbor:

- Damjan Radosavljevič, predsednik
- Miro Gorenšek
- Nevenka Kregar Velikonja
- Matej Drobnič

- Miomir Knežević

Nadzorni odbor:

- Branko Koritnik, predsednik
- Matjaž Jeras
- Primož Rožman
- Matevž Gorenšek

4. Določitev članarine društva

Občni zbor je potrdil predlog, da bo članarina za leto 2007 znašala 15 EUR.

5. Načrt aktivnosti društva

- organizacija naslednjega Cartilage weekenda

Naslednji CW bo predvidoma maja 2008. Organizacijski odbor se bo prvič sestal v začetku maja. Predsednik organizacijskega odbora bo dr. Matej Drobnič. Ideja je, da postane CW osrednji tkivno-inženirski dogodek v JV Evropi in da se morebiti lokacija vsaki dve leti seli tudi v druge države. Člani društva so pozvani k sodelovanju pri organizaciji simpozija.

- organizacija izobraževalnih simpozijev : društvo bo nadaljevalo z organizacijo strokovnih srečanj. Poleg naslednjih dveh predlogov so seveda dobrodošli dodatni predlogi. Zaželeno je, da so srečanja najavljena vsaj dva meseca vnaprej zaradi organizacije in registracije na Zdravniški zbornici.

- 28.maja 2007 bo predvidoma organiziran simpozij v okviru DCTIS z delovnim naslovom "The use of stem cells in cardiac and orthopaedic tissue engineering: Basic research and strategies for translation into clinical applications".

Gostja bo prof. Gordana Vunjak Novakovič (Professor, Department of Biomedical Engineering, Columbia University). Prof. Vunjak-Novakovič je bila pred tem na MIT, v skupini 'očetov tkivnega inženirstva' Langerja in Vacantija.

- Strokovno srečanje na temo bio-bank.

- pobude za druge aktivnosti društva

Usklajevanje terminologije s področja tkivnega inženirstva. Podan je bil predlog, da bi se povezali z eno od obstoječih terminoloških komisij s področja naravoslovnih znanosti.

Ob predstavitvi dr. Rožmana so bile zbrane pripombe na predlog zakona. Pripombe bodo v imenu društva DCTIS posredovane na pristojno ministrstvo.

Zapisnik pripravila:

Nevenka Kregar Velikonja,
Tajnica DCTIS

Prim. Damjan Radosavljevič, dr. med.
Predsednik DCTIS

SPONZORJI IN PODPORNİ ČLANI DCTIS

Delovanje društva in organizacija izobraževanj ne bi bila mogoča brez prispevkov sponzorjev in podpornih članov društva DCTIS.

V letih 2006/2007 so naše delovanje omogočili:

Prostor (predavalnice) za izvedbo izobraževalnih sestankov sta nam omogočila:

- KC Ljubljana, Ortopedska Klinika



- Zavod RS Slovenije za transfuzijsko medicino



Podporni člani društva so:

- Educell d.o.o.
- Neocelica d.o.o.

Sponzorji in donatorji, ki so omogočili organizacijo simpozija "The use of stem cells in cardiovascular and orthopaedic tissue engineering: Basic research and strategies for translation into clinical applications"

- Zavod RS Slovenije za transfuzijsko medicino (generalni pokrovitelj)
- Educell d.o.o.
- Kemomed d.o.o.
- Bia d.o.o.

Vsem naštetim in drugim, ki nam kakorkoli pomagajo se najlepše zahvaljujemo!



Bia Podjetje za laboratorijsko in procesno opremo d.o.o
Teslova 30, 1000 Ljubljana,
Tel: 01 426 4588;
Fax: 01 426 4591
e-mail: sales@bia.si
Web: www.bia.si

BIA je družba z omejeno odgovornostjo iz Ljubljane, ki deluje že več kot 17 let. Zaposluje 7 visoko specializiranih strokovnjakov, ki opravljajo dela na področju trženja in razvoja.

Naša glavna dejavnost je prodaja izdelkov in storitev na naslednjih področjih: biotehnologija, kromatografija, organske sinteze in laboratorijska oprema.

V programu **biotehnologije** ponujamo pester izbor izdelkov, nepogrešljivih za uporabo na področju life-science raziskav, spremljanja celičnih procesov, proizvodnje bioučinkovin in kontrole kvalitete:

- sistemi za separacijo nukleinskih kislin in proteinov,
- sistemi za detekcijo endotoksinov,
- kiti za bioanalize,
- celični sistemi,
- reagenti za gojenje celičnih kultur,
- orodja za proteomiko, imunodetekcijo in RNAi tehnologijo,
- protitelesa, rekombinantni proteini, restrikcijski in PCR encimi.
- stresalniki in bioreaktorji

Kot rezultat naših razvojnih prizadevanj lahko poudarimo ustanovitev spin-off podjetja [BIA Separations](http://www.bia.si), ki je svetovni vodja v izdelavi monolitnih kromatografskih nosilcev za analizo in

Razvoj in raziskave na področju celičnega in tkivnega inženirstva



ChondroArt™ – gojene avtologne hrustančne celice za zdravljenje poškodb sklepnega hrustanca



EDUCCELL podjetje za celično biologijo d.o.o. zaposluje strokovnjake s področja biotehnologije, biomedicine, farmacije in sorodnih ved.

Razvijamo tkivno-inženirske metode za obnovo sklepnega hrustanca, kosti in drugih poškodovanih ali okvarjenih tkiv. Z načinom zdravljenja, pri katerem uporabljamo bolnikove lastne celice, ki jih v laboratoriju namnožimo in ustrezno pripravimo, v sodelovanju z vrhunskimi kirurgi povrnemo tkivom njihovo naravno funkcijo, bolnikom pa kakovost življenja, kot so ga imeli pred poškodbo.

CHONDROart

Vabilo novim članom

Poziv k sodelovanju

Društvo za celično in tkivno inženirstvo vabi vse, ki se ukvarjate z uporabo tkivno inženirskih metod v medicini, s celičnimi tehnologijami, biomateriali in sorodnimi vedami, ki so pomembne pri raziskavah in uvajanju celičnega in tkivnega inženirstva v klinično prakso, da se nam pridružite in prispevate k uresničevanju ciljev društva.

S plačilom članarine društva v višini 15 EUR, ki jo nakažete na račun društva (DCTIS, Zaloška cesta 9, Ljubljana, št. računa: 02014-0254997735), postanete član društva. Lahko pa nam pošljete izpolnjeno pristopno izjavo, na podlagi katere vam bomo poslali položnico.

---✂-----✂---

Pristopna izjava

Podpisani _____, rojen _____ se želim včlaniti v Društvo za celično in tkivno inženirstvo.

Informacije o delovanju društva želim prejemati na naslov: _____

oz. na elektronski naslov: _____

Navedene osebne podatke dovolim uporabljati za namen delovanja društva.

Podpis:
