

## Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-0684-12**

**Štúdium imunomodulačných a regeneračných vlastností mezenchýmových stromálnych buniek na in vitro modeli osteoartritídy**

Zodpovedný riešiteľ **MVDr. Ján Rosocha, CSc.**

Príjemca **Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Združená tkanivová banka UPJŠ LF a UNLP Košice
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Nie je.
- 2.
- 3.

### Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

1. Nie sú.
- 2.
- 3.

### Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. A Preliminary Study Comparing Microfracture and Local Adherent Transplantation of Autologous Adipose-Derived Stem Cells Followed by Intraarticular Injection of Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Chondral Defects in Rabbits. Cartilage. DOI: 10.1177/1947603517713816 | First Published June 13, 2017 online. ŠPAKOVÁ, Tímea - AMRICHOVÁ, Judita - PLŠÍKOVÁ, Jana - HARVANOVÁ, Denisa - HORNAK, Slavomir – LEDECKY, Valent - ROSOCHA, Ján - publikácia v karentovanom časopise
2. Influence of kartogenin on chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived MSCs in 2D culture and in co-cultivation with OA osteochondral explant. Brazilian Journal of Medical and Biological Research – Manuscript ID 7012 – Poslané do redakcie na posudzovanie. ŠPAKOVÁ, Tímea - PLŠÍKOVÁ, Jana - HARVANOVÁ, Denisa – LACKO,

Marek – STOLFA, Stefan – CELLAR, Robert – ROSOCHA, Jan - publikácia v karentovanom časopise

3. Bioactive Mediators Associated with Mesenchymal Stem Cells-Mediated Immunomodulation. - Č. projektu: MŠ SR - APVV 0684-12, MŠ SR - Sekcia vedy a techniky ITMS 26220220185, VEGA 15/GSD/2012. In: Jacobs Journal of Bone Marrow and Stem Cell Research [elektronický zdroj]. - ISSN 2381-2745. - Vol. 1, no. 2 (2015), online, s. 1-11. ZACHAR, Lukáš, BAČENKOVÁ, Darina, ŠOLTYS, Jindřich, ROSOCHA, Ján - Vedecká práca v recenzovanom vedeckom časopise

4. Preparation of in vitro model for analysis of therapeutic potential of MSCs in process of OA knee cartilage degradation. - Č. projektu: MŠ SR - APVV 0684-12, VEGA 1/0772/13, Iné granty domáce MediPark ITMS 26220220185. In: Regenerative Medicine. - ISSN 1746-0751. - Vol. 10, no. 07s (2015), s. 145. PLŠÍKOVÁ, Jana, ŠPAKOVÁ, Tímea, HARVANOVA, Denisa, KOSTELNÁ, Helga, KLUKA, Teodor, LACKO, Marek, ROSOCHA, Ján - Vedecká práca v recenzovanom vedeckom časopise

5. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment . In: Journal of Inflammation Research. – Vol. 9, (2016) s. 231-240. ZACHAR, Lukáš - BAČENKOVÁ, Darina - ROSOCHA, Ján - Vedecká práca v recenzovanom vedeckom časopise

6. Effect of in vitro differentiation of human mesenchymal stem cells on cartilage repair in osteoarthritis of knee joint - Č. projektu: VEGA 1/0217/16, MŠ SR - APVV 0684-12. In: European Cells and Materials. - ISSN 1473-2262. - Vol. 32, Suppl. 3 (2016) p. 61. ŠPAKOVÁ, Tímea - PLŠÍKOVÁ, Jana - HARVANOVA, Denisa - LACKO, Marek - ROSOCHA, Ján - Vedecká práca v recenzovanom vedeckom časopise

7. Imunomodulačné vlastnosti mezenchýmových kmeňových buniek a ich asociácia s produkciou bioaktívnych faktorov. In: Slovenská lekár. Ročník 26 (40), číslo 5-6 (2016), s.99-106. ZACHAR, Lukáš - ROSOCHA, Ján - Vedecká práca v recenzovanom vedeckom časopise

8. Preparation of in vitro model of osteoarthritis mediated by pro-inflammatory cytokines activated synovial fibroblasts for analysis of therapeutic potential of mesenchymal stem - Č. projektu: MŠ SR - APVV 0684-12, VEGA 1/0772/13, VEGA 1/0773/17, Iné granty domáce MediPark ITMS 26220220185. In: European Cells and Materials. - ISSN 1473-2262. - Vol. 33, Supl. 2 (2017), s. 214. PLŠÍKOVÁ, Jana - ŠPAKOVÁ, Tímea - HARVANOVA, Denisa - ČELLÁR, Róbert - ŠEPITKA, Rastislav - KLUKA, Teodor - KOVAL', Karol - ROSOCHA, Ján - Vedecká práca v recenzovanom vedeckom časopise

9. Study of the effect of synovial fluid and synovial fibroblasts from patients with OA on the healthy knee joint cartilage and influence of human mesenchymal stem cells on the process of regeneration - in vitro studies. - Č. projektu: VEGA 1/0217/16, MŠ SR - APVV 0684/12, Iné granty domáce Medipark ITMS: 26220220185. In: European Cells and Materials. - ISSN 1473-2262. - Vol. 33, Supl. 2 (2017), s. 260. HARVANOVA, Denisa - ŠPAKOVÁ, Tímea - PLŠÍKOVÁ, Jana - LACKO, Marek - FILIP, Vladimír - KEPÍČ, Ján - KLUKA, Teodor - ROSOCHA, Ján - Vedecká práca v recenzovanom vedeckom časopise

### **Uplatnenie výsledkov projektu**

Analýza a korelácia aktivity informačných biomolekúl v synoviálnej tekutine a v sére pacientov môže prispieť k presnejšiemu stanoveniu typu artritídy a štádia OA a v blízkej budúcnosti môže umožniť cielene liečiť aj OA proces. Nami vytvorený funkčný in vitro model OA a následné analýzy produktov buniek zúčastňujúcich sa na deštrukcii a následnej regenerácii chrupky prispievajú k potenciálnemu riešeniu tohto medicínskeho problému. Na základe našich predbežných výsledkov in vitro štúdií môžeme predpokladať, že mezenchýmové kmeňové bunky majú potenciál v liečbe OA.

### **CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV**

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku**

(max. 20 riadkov)

Použitím humánnych osteochondrálnych cylindrov bol v rámci projektu vytvorený funkčný in vitro model OA, v ktorom bola chrupka vystavená účinku synoviálnych fibroblastov resp. rekombinantných zápalových cytokínov (IL-1beta a TNFalfa) alebo synoviálnej tekutiny, ktoré sa pri OA výrazným podielom zúčastňujú procesu jej deštrukcie. Na vytvorenom funkčnom modeli OA bol následne sledovaný terapeutický potenciál mezenchýmových kmeňových buniek (MKB) izolovaných z tukového tkaniva. Poškodenie chrupky a vplyv MKB bolo overené a potvrdené súborom morfológických (SEM, cytoskelet) a histologických metód (HE, Safranin O, Alcianová modrá) na úrovni buniek a tkaniva resp. analýzou produkcie zápalových a protizápalových biomolekúl. Výsledky analýz synoviálnych tekutín od OA pacientov poukázali na vyššie koncentrácie zápalových markerov IL-6 a IL-8. Produkcia degradačných MMP resp. zápalových cytokínov synoviálnymi fibroblastami bola signifikantne vyššia po aktivácii kombináciou IL-1beta a TNFalfa resp. synoviálnou tekutinou. Z výsledkov viacerých analýz vyplýva, že práve synoviálna tekutina od OA pacientov spôsobila najefektívnejšiu deštrukciu chrupky v in vitro modeli po 2 týždňovej degradácii. Po následnej kokultivácii degradovaného cylindra s MKB bol potvrdený hlavne imunomodulačný vplyv týchto buniek, ktorý bol najviac viditeľný na úrovni produkcie testovaných biomolekúl. V projekte bol potvrdený aj účinok kartogénínu na zvýšenie chondrogénneho potenciálu MKB v in vitro modeli použitím chrupky od OA pacientov, pričom imunomodulačný potenciál MKB nebol negatívne ovplyvnený. Vytvorenie funkčného in vitro modelu OA umožnil analyzovať protizápalový a regeneračný účinok rôznych molekúl na degradovanej humánnej chrupke. Tento model môže byť použiteľný aj v iných štúdiách, nakoľko do väčšej miery modeluje skutočné podmienky in vivo.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku**

(max. 20 riadkov)

The functional human in vitro model of OA was created in this project, in which the cartilage of human tissue donors was exposed to the action of synovial fibroblasts, inflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalfa) and synovial fluid, respectively. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from adipose tissue was observed in process of OA using this functional in vitro model. Cartilage degradation and the action of MSCs were demonstrated and confirmed by the set of different methods, including morphological (SEM, cytoskelet) and histological analysis (HE, Safranin O, Alcian Blue), and analysis of the production of inflammatory/proinflammatory biomolecules in media. The results of synovial fluid's analysis from OA patients shown higher concentrations of inflammatory markers IL-6 and IL-8. Production of degradation MMP/inflammatory cytokines by synovial fibroblasts were significantly higher after activation with the combination of IL1beta and TNFalfa and synovial fluid. Based on the results of several analysis, the most effective degradation of cartilage in in vitro model was resulted by the use of synovial fluid obtained from OA patients after 2 weeks of cocultivation. The effect of MSCs on damaged cartilage was significant mainly by the production of tested biomolecules, which confirmed the immunomodulatory action of these cells. In this project, an approach to the assessment of effect of kartogenin in an in vitro OA model was also described. The results suggest that KGN promoted chondrogenic differentiation of MSCs with no negative effect on immunomodulatory response of MSCs. Establishment of functional in vitro model of OA allowed to study an inflammatory and regenerative effect of different molecules on degraded human cartilage. This model could be successfully used also in another studies, because it simulates natural conditions in vivo more extensively.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

**Zodpovedný riešiteľ**

MVDr. Ján Rosocha, CSc.

V Košiciach 11. 10. 2017

**Štatutárny zástupca príjemcu**

prof. RNDr. Pavol Sovák, CSc.

V Košiciach 11. 10. 2017

.....  
podpis zodpovedného riešiteľa

.....  
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu