

# Projektbericht

## Mesenchymale Stammzellen aus Nabelschnurgewebe als alternative Zellquelle zur Regeneration von Knorpeldefekten

**Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen**

Laufzeit 01.01.23-30.06.24

### Projektleitung

Dr. Anne Bernhardt, Senior Scientist am Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung, Medizinische Fakultät und Uniklinikum der TU Dresden

Prof. Dr. Jörg Lützner, Leiter der Sektion Knie, des EndoProthetikZentrums und des Bereichs Klinische Studien am UniversitätsCentrum für Orthopädie, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie

### Projektmitarbeit

B. Sc. Emily Fichter

*cand. med.* Johanna Bellstedt,

Dr. rer. nat. Anja Lode

Dr. med. Henriette Bretschneider

## Populärwissenschaftlicher Bericht

Knorpelschäden, die durch Sportverletzungen und Unfälle hervorgerufen wurden, sind ein großes medizinisches Problem, weil verletztes Knorpelgewebe kaum von allein heilt. Um die Heilung verletzten Knorpels zu erreichen, müssen unterstützende Maßnahmen ergriffen werden, wie z.B. die Implantation von (körpereigenen) Zellen. Hierfür werden entweder Knorpelzellen verwendet, die an einer gesunden Stelle des Knorpels entnommen, im Labor vermehrt und in den Defekt eingebracht werden (autologe Chondrozytentransplantation) oder der unter dem Knorpel liegende Knochen wird angebohrt, damit Stammzellen aus dem Knochenmark in den Defekt einwandern können (Knochenmarkstimulation). Eine weitere Möglichkeit ist die Behandlung mit Stammzellen, die durch die Ausschüttung von Botenstoffen die Knorpelregeneration unterstützen können. Nachteilig ist hier die Gewinnung aus Knochenmark, da sich in diesem Falle der Patient/die Patientin einer weiteren Operation unterziehen muss. Alternativ können Stammzellen aus Nabelschnurgewebe verwendet werden, die quasi als „Abfallprodukt“ anfallen. Ziel unseres Projektes war es, durch Versuche im Zellkulturlabor herauszufinden, ob Nabelschnurstammzellen sich genauso gut für die Regeneration von Knorpel eignen, wie die bisher verwendeten Stammzellen aus Knochenmark. Wir haben dazu menschliche Knorpelzellen im Labor zu kleinen, kugelförmigen Gebilden (Pellets) fusioniert, die selbst Knorpelgewebe produzieren. Diese künstlich erzeugten Knorpelstückchen wurden in Gegenwart von Botenstoffen, die von den Stammzellen aus Knochenmark und Nabelschnur produziert wurden, weiter kultiviert. Die Stammzellen wurden in diesen Versuchen als einfache Zellschichten, aber auch eingebettet in Gele oder poröse Schwämme untersucht, um herauszufinden, in welcher Form die Zellen später den Patient:innen am besten verabreicht werden sollten. Wir konnten zeigen, dass Stammzellen aus Nabelschnur unter entzündlichen Bedingungen mehr Interleukin-10 (ein entzündungshemmender Botenstoff) freisetzen als Knochenmarkstammzellen. Auch die Freisetzung von GDF5, einem Wachstumsfaktor, der die Knorpelheilung unterstützt, war bei den Stammzellen aus Nabelschnur höher. Es zeigte sich allerdings auch, dass nur Stammzellen, die in einfachen Zellschichten kultiviert wurden, die Regeneration von Knorpel anregen konnten. Sobald die Stammzellen in komplexeren Gebilden vorlagen, war leider kein Effekt auf die Produktion von Knorpelgewebe mehr feststellbar. Hier sollten weitere Untersuchungen erfolgen, vorstellbar wäre u.a. die Erhöhung der Dichte an Stammzellen in den Konstrukten, und/oder die Kultivierung in kleineren Volumina, um einen besseren Effekt auf die Knorpelzellen zu erzielen. Weiterhin wurden Untersuchungen zur Applikation der Zellen im Knorpeldefekt durchgeführt und erste Hinweise zum Umgang mit Nabelschnurstammzellen in der klinischen Anwendung erarbeitet.

## Projektziel

Das Ziel des Projektes war es, in einem *in vitro* Modell den Einfluss von mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus Knochenmark und Nabelschnurgewebe auf die Regeneration von Knorpel vergleichen. Diese Untersuchungen sollten die wissenschaftliche Grundlage bilden für den perspektivischen Einsatz von allogenen MSC aus Nabelschnurgewebe anstelle von autologen MSC aus Knochenmark bei der Regeneration von Gelenkknorpeldefekten.

Hierfür sollte ein *in vitro*-Knorpelmodell entwickelt werden, das eine Kokultivierung von primären, humanen Chondrozyten, isoliert aus Gelenkknorpel mit humanen Stammzellen aus Nabelschnurgewebe (WJ-MSC) bzw. aus Knochenmark (BM-MSC) erlaubt. Der Einfluss der Zellen bzw. von ihnen sezernierten Zytokinen auf die Proliferation und Matrixbildung der Chondrozyten sollte verglichen werden. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit die Form, in der die Zellen perspektivisch in den Defekt eingebracht werden (als Einzelzellsuspension, als Aggregate, in Hydrogel eingebettet oder in einer Kollagenmatrix) die Effekte auf die Knorpelregeneration beeinflussen können.

## Ergebnisse

### Arbeitspaket 1: Isolation, Expansion und Charakterisierung primärer humaner Chondrozyten

Im Rahmen der Arbeiten konnten insgesamt Chondrozyten aus dem Gelenkknorpel von 9 Patient:innen isoliert werden (Tabelle 1).

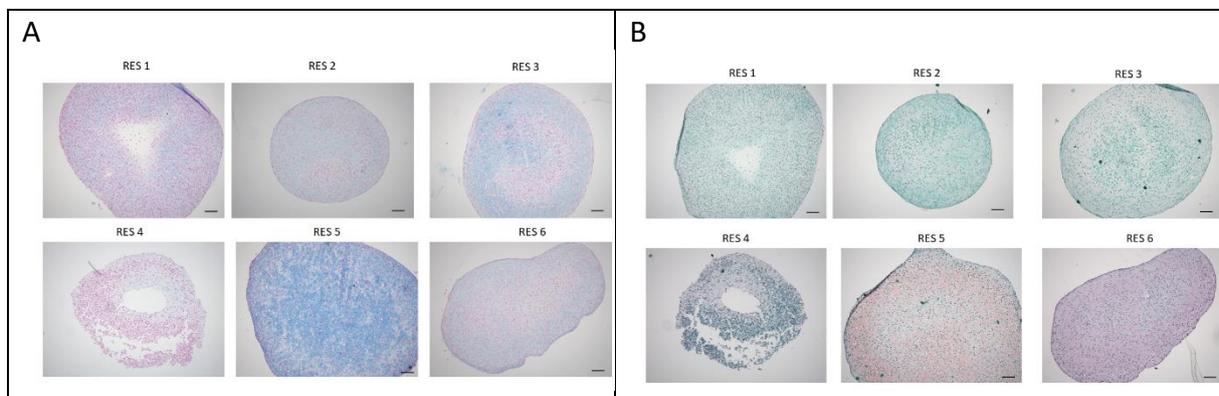


Abb. 1: Pellets aus den isolierten und bis zur 4. Passage expandierten Chondrozyten nach 21 Tagen chondrogener Stimulation, fixiert, eingebettet in Paraffin, 5 µm Schnitte, A : Alcianblau Färbung, B Safranin-O Färbung, Maßbalken 100 µm

Alle Zellen wurden bis zur 4. Passage expandiert. Pelletkulturen wurden angelegt und über 21 Tage chondrogen stimuliert. Nach Fixierung und Einbettung in Paraffin wurden histologische Schnitte angefertigt und extrazelluläre Knorpelmatrix angefärbt (Abb. 1)

Tabelle 1: Alter und Geschlecht der Patient:innen, deren Gewebe zur Chondrozytenisolation verwendet wurde

RES1	Männlich, 65	RES4	Männlich 63	RES7	Weiblich 62
RES2	Männlich, 64	RES5	Männlich 55	RES8	Weiblich 62
RES3	Männlich, 56	RES6	Weiblich 49	RES9	Weiblich 62

Die Zellen des Spender RES 5 zeigten eine deutliche Produktion extrazellulärer Knorpelmatrix und wurden daher als gut geeignet für die Etablierung der Kokulturen identifiziert.

### Arbeitspaket 2: Chondrogene Differenzierung von BM-MSC und WJ-MSC

Die genannten Stammzellen wurden analog zu den Chondrozyten in Pelletkulturen gebracht, über 21 Tage chondrogen stimuliert und als histologische Schnitte aufbereitet. Es konnten unterschiedliche Menge extrazellulärer Knorpelmatrix nachgewiesen werden. Auch hier war die chondrogene Differenzierung stark spenderabhängig (Abb. 2).

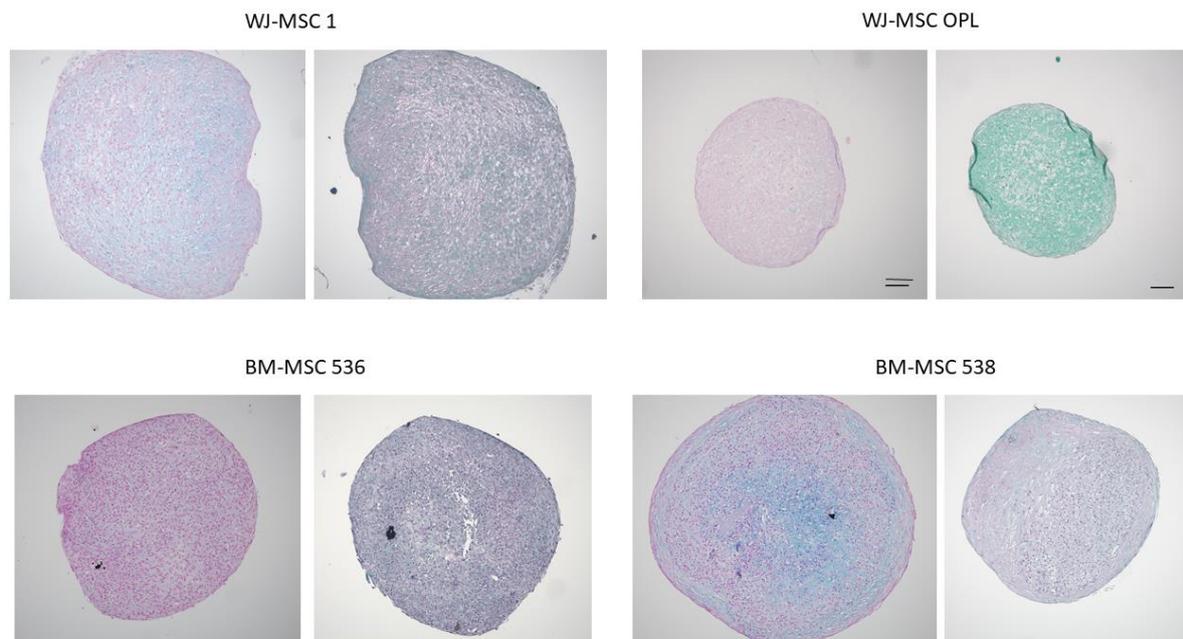


Abb. 2: Pellets aus WJ-MSC und BM-MSC nach 21 Tagen chondrogener Stimulation, fixiert, eingebettet in Paraffin, 5 µm Schnitte, jeweils links Alcianblau Färbung, rechts Safranin-O Färbung, Maßbalken 100 µm

Genexpressionsanalysen ergaben, dass sowohl WJ MSC als auch BM MSC unter chondrogener Stimulation eine signifikant weniger chondrogene Marker exprimieren als Chondrozyten, jedoch mehr Kollagen I, ein Marker, der typisch ist für MSC (Abb. 3) Dieses Verhalten ist aus der Literatur bekannt. Da die MSC zur Sekretion von Zytokinen in den Defekt eingebracht werden sollten, ist eine chondrogene Differenzierung aber auch nicht nötig.

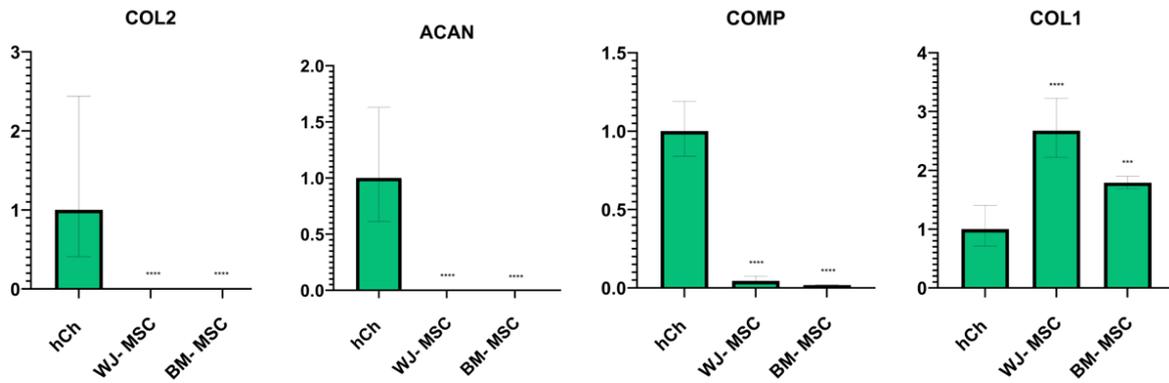


Abb. 3: Genexpression der typischen Chondrozytenmarker Kollagen II (COL2), Aggrecan (ACAN) und cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in Pellets aus Chondrozyten, WJ-MSC und BM-MSC. Expression von Kollagen I als nicht-chondrogener Marker.

### Arbeitspaket 3: Besiedlung einer Kollagenmembran mit WJ-MSC

Zur Applikation von MSC in Knorpeldefekte ist u.a. eine Kollagenmembran (Chondro-Gide®) vorgesehen, die bereits für die autologe Chondrozytentransplantation zugelassen ist. Daher sollte untersucht werden, wie lange WJ MSC benötigen, um sich an der Membran anzuheften. Da Zeit im OP sehr knapp bemessen ist, sollte die kürzest mögliche Zeit bestimmt werden, die zur initialen Zelladhäsion nötig ist, bevor die zellbeladene Membran in den Defekt transferiert wird. Je 225.000 WJ-MSC wurden als Suspension auf je 0,25 cm<sup>2</sup> große Membranen pipettiert und nach verschiedenen Inkubationszeiten fixiert und angefärbt. Innerhalb der ersten 15 min zeigten die Zellen noch eine runde Morphologie, erst nach 4 Stunden wurden F-actin Fasern sichtbar, die auf eine Zelladhäsion hinwiesen (Abb. 4).

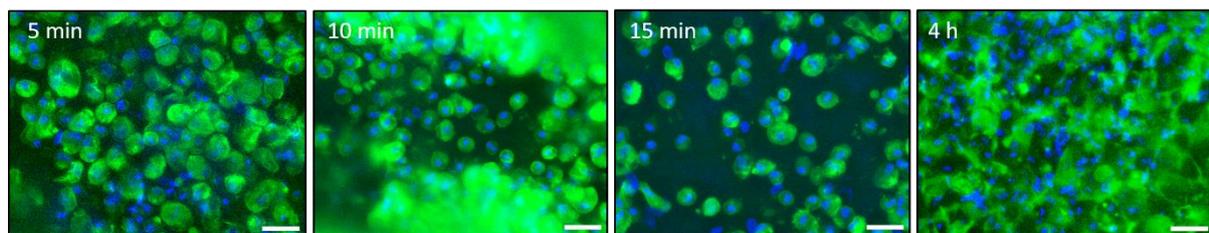


Abb. 4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von WJ-MSC auf ChondroGide Membranen nach unterschiedlichen Adhärenzzeiten, Kerne blau, Zytoskelett grün, Maßbalken 50 µm.

Um herauszufinden, ob auch Zellen mit runder Morphologie, die noch nicht adhärert sind, während der Implantation der Membran auf der Oberfläche verbleiben, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Hierbei sollte die Manipulation während der Operation (arthroskopisch unter Absaugung) nachgestellt werden. Dazu wurden die zellbesiedelten Membranen nach verschiedenen Zeitpunkten mit je 50 ml PBS gespült (appliziert durch serologische Pipetten und die Flüssigkeit sogleich wieder abgesaugt. Nach Fixierung und Färbung ergab sich folgendes Ergebnis (Abb. 5): Im Vergleich zur unbehandelten Proben

wurde ein großer Anteil der lose angehefteten Zellen beim Spülen entfernt. Somit muss von einem größeren Zellverlust bei der Applikation auf Membranen ausgegangen werden.

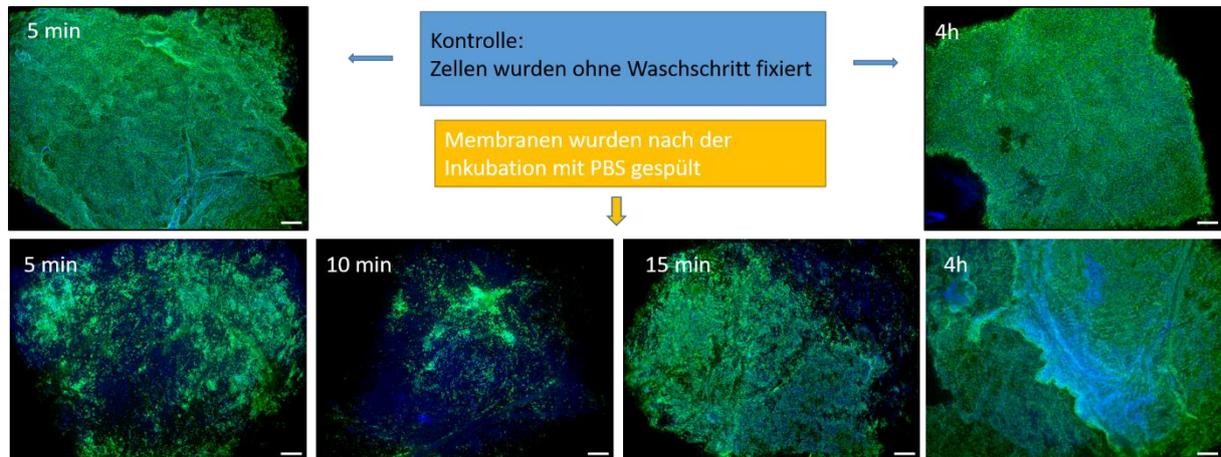


Abb. 5: Übersichts-Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von WJ-MSC auf ChondroGide® Membranen nach unterschiedlichen Adhärenzzeiten und Spülung, Kerne blau, Zytoskelett grün, Maßbalken 1000 μm

#### Arbeitspaket 4: Kultivierung von Chondrozyten Pelletkulturen mit konditioniertem Medium von WJ-MSC und BM-MSC

Eine Schwierigkeit, die sich häufig bei Verwendung von konditioniertem Medium ergibt, sind die unterschiedlichen Anforderungen, die verschiedene Zellspezies an das Kultivierungsmedium stellen. MSC werden normalerweise in Gegenwart von 10 % fötalem Kälberserum kultiviert, wohingegen die chondrogene (Re) Differenzierung von Chondrozyten unter serumfreien Bedingungen (unter Zusatz von Insulin, Selen und Transferrin) erfolgt. Schon kleine Mengen Serum führen zu einer drastischen Reduktion der Kollagen II Expression [1]. Somit sollten die WJ-MSC für die Gewinnung von konditioniertem Medium serumfrei kultiviert werden. Zunächst wurden verschiedene serumfreie Medien zur Kultivierung von UC-MSC getestet. Es wurde der Zusatz von Insulin, Transferrin und Selen (ITS), ITS + bovinem Serumalbumin (ITS +1), sowie der Zusatz von basic fibroblast growth factor (bFGF) getestet [2–5]. Nur im letztgenannten Medium zeigte sich eine deutliche Proliferation der WJ-WSC, während in den anderen beiden Medien die Zellzahl über 21 Tage sogar abnahm. In einem zweiten Experiment wurden Pelletkulturen aus Chondrozyten in den drei genannten Medien über 21 Tage kultiviert chondrogen differenziert. Es zeigte sich, dass die Zugabe von bFGF die Expression chondrogener Marker signifikant erniedrigt (Abb. 6A). Somit musste die Kultivierung von WJ-MSC zur Produktion von konditioniertem Medium ohne bFGF erfolgen, wobei die Abnahme der Zellzahl über den Kultivierungszeitraum von 21 Tagen in Kauf genommen wurde.

Das von den WJ MSC konditionierte Medium (zwei verschiedene Spender wurden untersucht) wurde entnommen, mit chondrogenen Differenzierungsfaktoren (TGF-β3 und Dexamethason), sowie in einigen Gruppen mit IL-1β (um eine Entzündung zu simulieren) versetzt und auf Pellets aus Chondrozyten gegeben. Nach 21 Tagen Kultivierung mit

Medienwechseln aller 3-4 Tage wurde RNA isoliert und die Genexpression chondrogener Marker analysiert (Abb. 6B). Es zeigte sich zum einen eine Zunahme der Genexpression in Gegenwart des konditionierten Mediums, die jedoch nur im Falle eines der beiden Spender signifikant war. Außerdem zeigte sich, dass nach Zugabe von IL 1 $\beta$  kaum noch eine Expression der chondrogenen Markergene erfolgte.

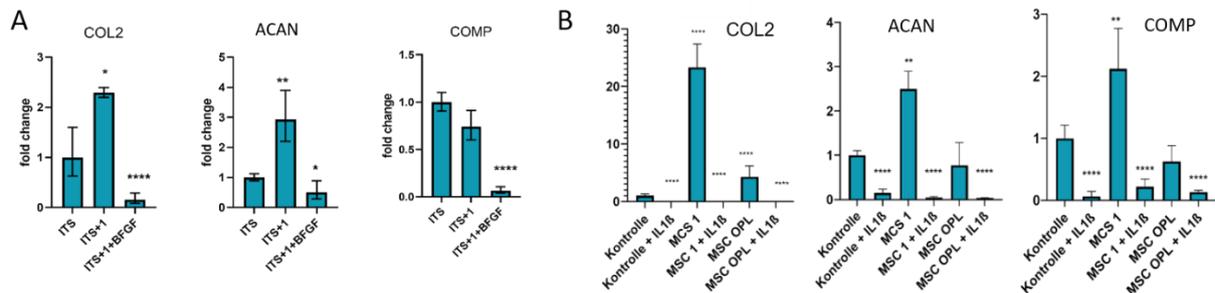


Abb. 6: Genexpression der typischen Chondrozytenmarker Kollagen II (COL2), Aggrecan (ACAN) und cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in Pellets aus Chondrozyten. A) Vorversuch: Einfluss verschiedener Medienzusätze auf die chondrogene Redifferenzierung, B) Einfluss von WJ-MSC konditioniertem Medium und IL 1 $\beta$  auf die chondrogene Redifferenzierung

Die fehlende chondrogene Differenzierung unter Einfluss von IL 1 $\beta$  wurde auch durch histologische Färbungen bestätigt (Abb.7). Es zeigte sich nicht nur eine gestörte Matrixbildung sondern auch eine Fragmentierung und Zerstörung der Pellets unter Entzündungsbedingungen.

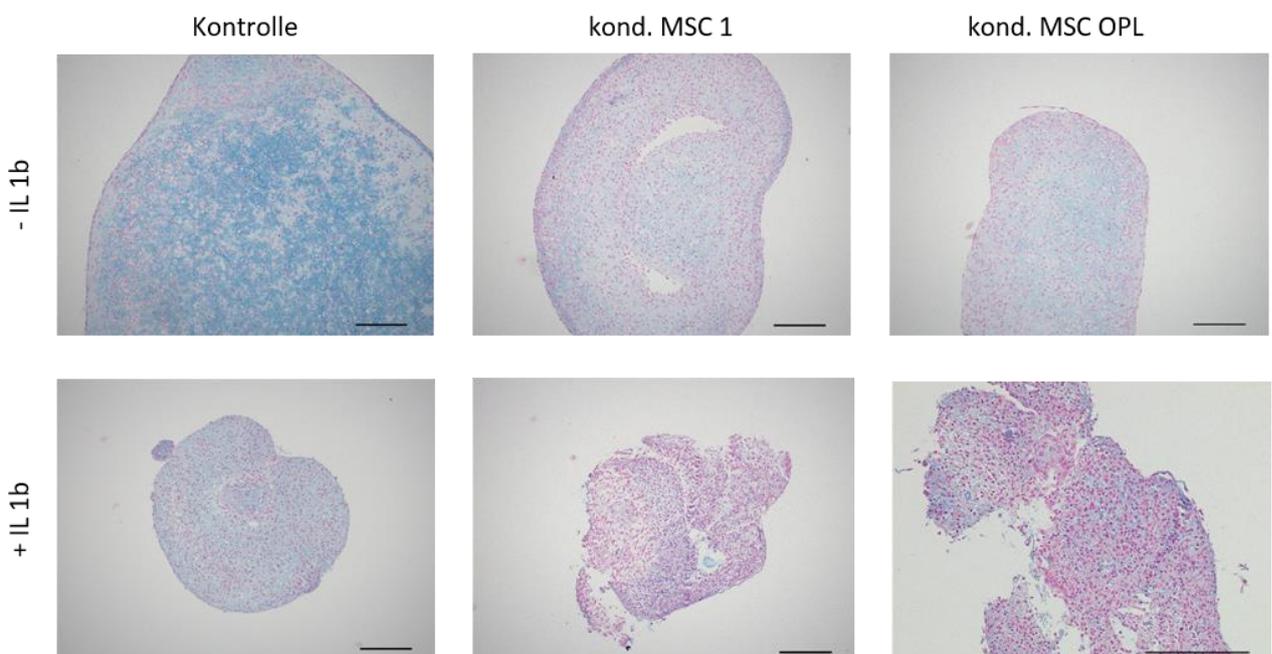


Abb. 7: Pellets des Spenders RES 5, die in Gegenwart von WJ-konditioniertem Medium unter Zusatz von TGF $\beta$ 3, Dex und IL 1 $\beta$  21 Tage kultiviert wurden, Alcianblau-Färbung von Paraffinschnitten, Maßbalken 200  $\mu$ m

## Arbeitspaket 5: Kokulturen von WJ-MSC und BM-MSC mit Chondrozyten in Pelletkulturen

Die Untersuchungen im AP4 umfassten den Transfer von durch hMSC konditioniertem Medium auf die chondrogenen Pelletkulturen. Hier wurden die chondrogenen Differenzierungsfaktoren TGF $\beta$  und Dexamethason erst kurz vor Zugabe zu den Pelletkulturen hinzugefügt, das heißt, die MSC wurden nicht chondrogen stimuliert.

In diesem Arbeitspaket sollten nun die Differenzierungsfaktoren TGF $\beta$  und Dexamethason bereits bei der Kultivierung der MSC zugegeben werden. Damit wird das Problem gelöst, dass die Zellzahl der MSC unter serumfreien Bedingungen abnimmt (siehe AP4), auf der anderen Seite werden die MSC so bereits chondrogen stimuliert und es ist nicht klar, ob unter diesen Umständen noch genügend antiinflammatorische und chondroanabole Zytokine produziert werden.

Die untersuchten Chondrozyten in Pelletkulturen zeigten nur in wenigen Fällen eine signifikant erhöhte Expression chondrogener Marker in der Gegenwart des durch MSC konditionierten Mediums. Generell führte die Zugabe des inflammatorischen Zytokins IL1 $\beta$  zu einer drastischen Reduktion der Expression der chondrogenen Marker (wie auch schon in AP4 beobachtet). Dabei spielte es keine Rolle, ob IL1 $\beta$  erst nach Entnahme des konditionierten Mediums zugegeben wurde (Abb. 8A) oder bereits während der Kultivierung der MSC zugegeben wurde (Abb. 8B).

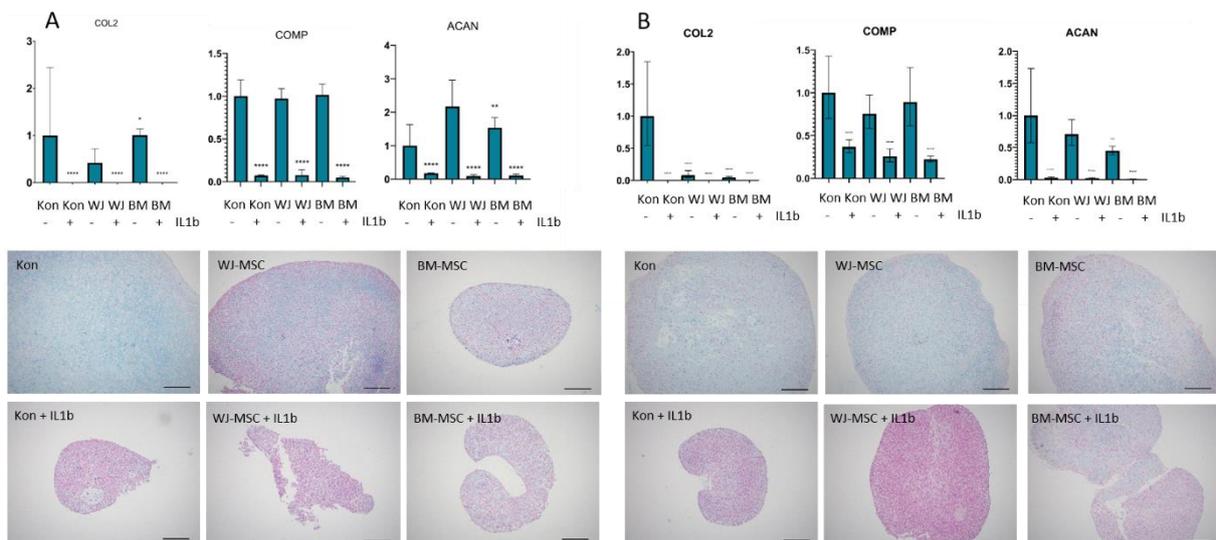


Abb. 8: Genexpression chondrogener Marker und Alcianblaufärbung von Chondrozyten-Pelletkulturen nach 21 Tagen Kultivierung in Gegenwart von konditioniertem Medium, das von chondrogen stimulierten WJ-MSC und BM-MSC, ebenfalls als Pellets, entnommen wurde, A) IL1 $\beta$  wurde nach der Konditionierung zugesetzt, B) IL1 $\beta$  wurde bereits während der Konditionierung des Mediums zugesetzt, Maßbalken 200  $\mu$ m

Untersuchungen der MSC-Pellets ergaben, dass die chondrogene Differenzierung der MSC mit einer deutlich geringeren Genexpression chondrogener Marker einherging (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte die Genexpression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 und des chondroanabolen

Zytokins TGF- $\beta$  in den MSC nachgewiesen werden (Abb.9) Sowohl BM MSC als auch WJ MSC zeigten eine Genexpression dieser beiden Marker und es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von IL-1 $\beta$  die Expression hochsignifikant erhöhte. Auf Proteinebene (ELISA) wurde darüber hinaus die Expression des Wachstumsfaktors GDF5 nachgewiesen. Diese schien unabhängig von der Zugabe von IL1 $\beta$  zu sein, MSC aus Nabelschnur sekretierten höhere Mengen an GDF5 und die Sekretion nahm mit längerer Kultivierung der MSC ab. Leider konnten weder TGF $\beta$  noch IL-10 oder IL-13 auf Proteinebene nachgewiesen werden. Möglicherweise lagen sie sekretierten Mengen unter dem Detektionslimit der verwendeten ELISA.

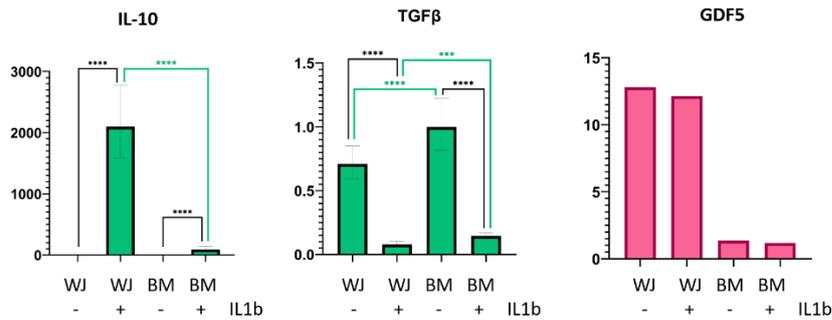


Abb. 9: Genexpression von IL-10 und TGF $\beta$  in Pellets aus WJ- und BM-MSC, die mit und ohne Zusatz von IL1 $\beta$  kultiviert wurden nach 21 Tagen Kultivierung. Proteinexpression von GDF5 nach 3 Tagen Kultivierung.

### Arbeitspaket 6: Einfluss der Applikationsform der MSC auf die Regeneration von Knorpel

Um MSC in einen Knorpeldefekt einzubringen, sind verschiedene Applikationsformen denkbar. Klinisch zugelassen ist bereits die Chondroguide<sup>®</sup> Kollagenmembran, die bereits im AP 3 getestet wurde. Darüber hinaus wurden noch andere Applikationsformen getestet: Sphäroide aus je ca. 25.000 Zellen, die mit der „hanging drop“ Methode erzeugt wurden [6], Alginatebeads, poröse Kollagenscaffolds, die in unserem Labor durch Fibrillierung und anschließende Gefriertrocknung und Vernetzung aus Rinderkollagen hergestellt wurden. Als Kontrolle wurde in allen Experimenten die Chondroguide<sup>®</sup> Kollagenmembran mitgeführt (Abb.10)



Abb. 10: Die vier untersuchten Applikationsformen für MSC: Sphäroide, Alginatebeads, Kollagenscaffolds und Kollagenmembranen.

Um die verschiedenen Applikationsmodelle miteinander zu vergleichen, wurden in allen betreffenden Experimenten je 2 Millionen WJ-oder BM-MSC zur Generierung von 12 ml konditioniertem Medium verwendet. Diese Zellen wurden entweder in 10 porösen Kollagenscaffolds (je 200.000 Zellen), auf 10 Kollagenmembranen 5\*5 mm (je 200.000 Zellen),

in Alginatbeads oder als Sphäroide in serumfreien Medium unter Zugabe von chondrogenem Differenzierungsmedium (inklusive TGF $\beta$  und Dexamethason) kultiviert. Hauptfragestellungen in diesem AP waren die Überlebensfähigkeit der Zellen in den verschiedenen Modellen, ihre Sekretion von antiinflammatorischen und chondroanabolen Zytokinen sowie der Einfluss auf die chondrogene Differenzierung von Chondrozyten.

WJ- und BM-MSC konnten in allen Modellen kultiviert werden. Lebend-Tot Färbungen zeigten zwar in allen Modellen auch nicht-vitale Zellen (Abb. 11), aber der Anteil an lebenden Zellen war ausreichend für alle nachfolgenden Analysen.

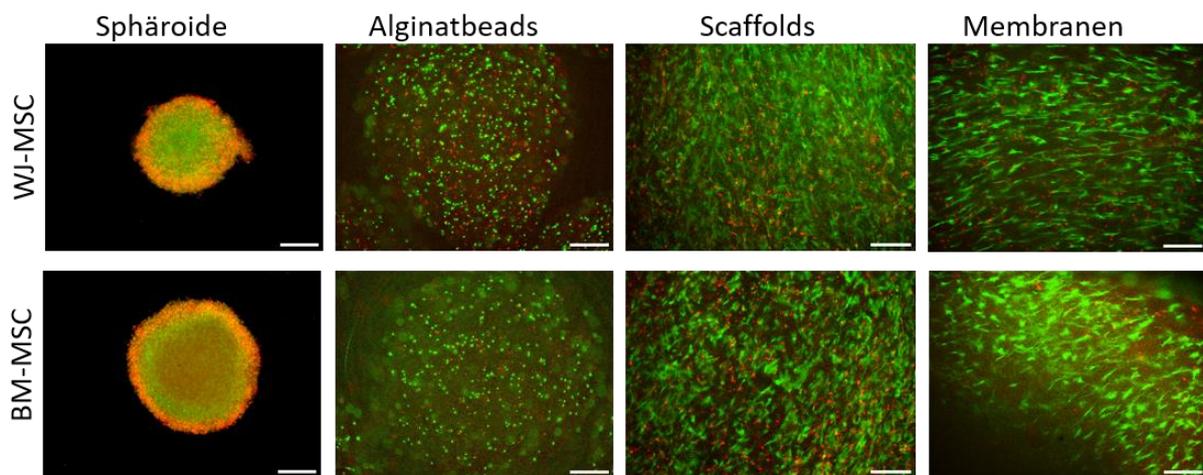


Abb. 11: Lebend-Tot Färbungen von WJ-MSC und BM-MSC in den verschiedenen Applikationsmodellen. Grün (Calcein AM) lebende Zellen, rot (Ethidium Homodimer) tote Zellen, Maßbalken 500  $\mu$ m für Sphäroide und Beads, 100  $\mu$ m für Scaffolds und Membranen

Das Sekretom der in den verschiedenen Modellen kultivierten MSC wurde mittels ELISA auf IL-10, IL-13, TGF- $\beta$  und GDF5 untersucht. Leider war keine Sekretion der drei erstgenannten Zytokine detektierbar. Die Sekretion von GDF5 zeigte deutliche Unterschiede sowohl zwischen den Applikationsmodellen als auch zwischen WJ- und BM-MSC (Abb.12).

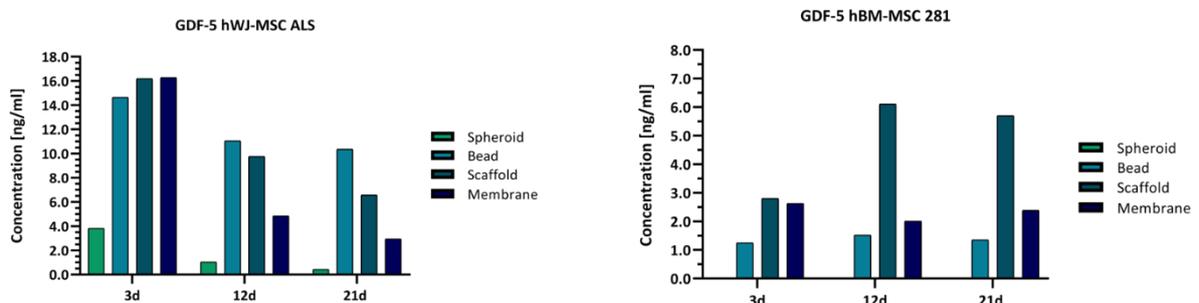


Abb. 12: Sekretion von GDF5 in konditioniertem Medium von WJ-MSC und BM-MSC in den verschiedenen Applikationsmodellen

Konditioniertes Medium von WJ- und BM MSC in den verschiedenen Applikationsmodellen schien die chondrogene (Re) differenzierung von Chondrozyten in Pelletkulturen kaum zu

stimulieren. So konnte eine lediglich bei WJ MSC eine erhöhte Genexpression von SOX9 verzeichnet werden (Abb.13).

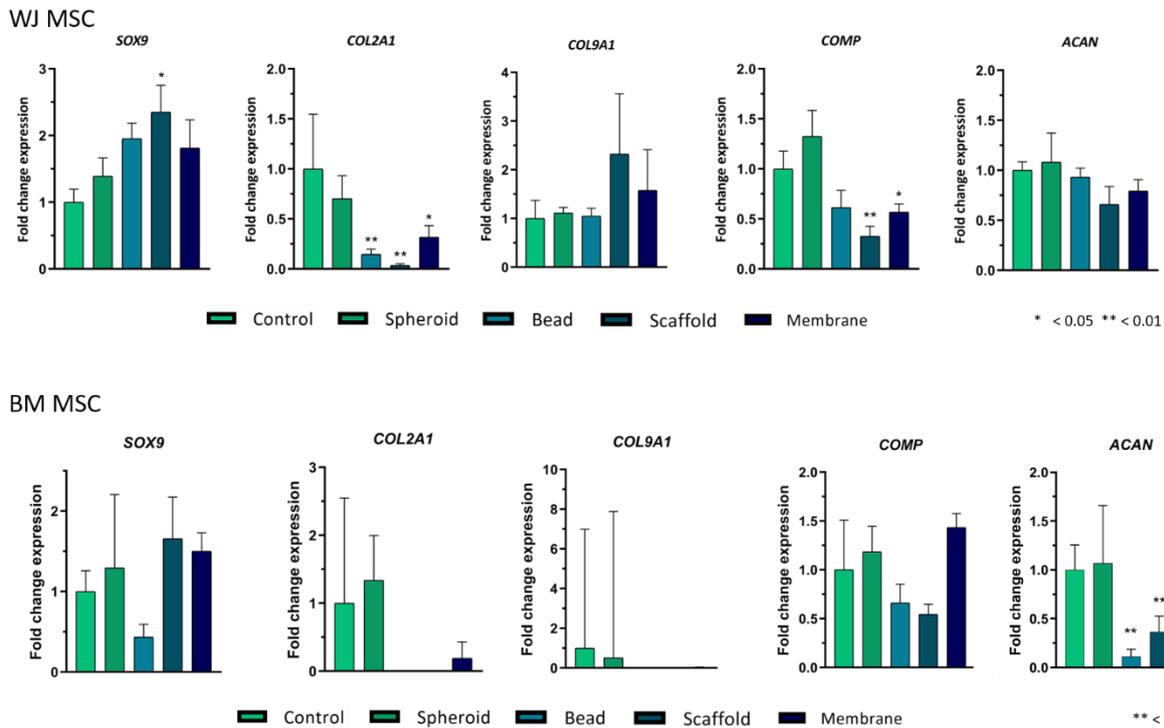


Abb. 13: Genexpression chondrogener Marker von Chondrozyten-Pelletkulturen nach 21 Tagen Kultivierung in Gegenwart von konditioniertem Medium, das von chondrogen stimulierten WJ-MSC und BM-MSC in vier verschiedenen Applikationsmodellen entnommen wurde. Als Kontrolle dienten jeweils Chondrozytenpellets, die mit Medium kultiviert wurden, das nicht in Kontakt zu MSC war.

Auch in der histologischen Darstellung der Chondrozyten sind keine deutlichen Unterschiede erkennbar (Abb. 13).

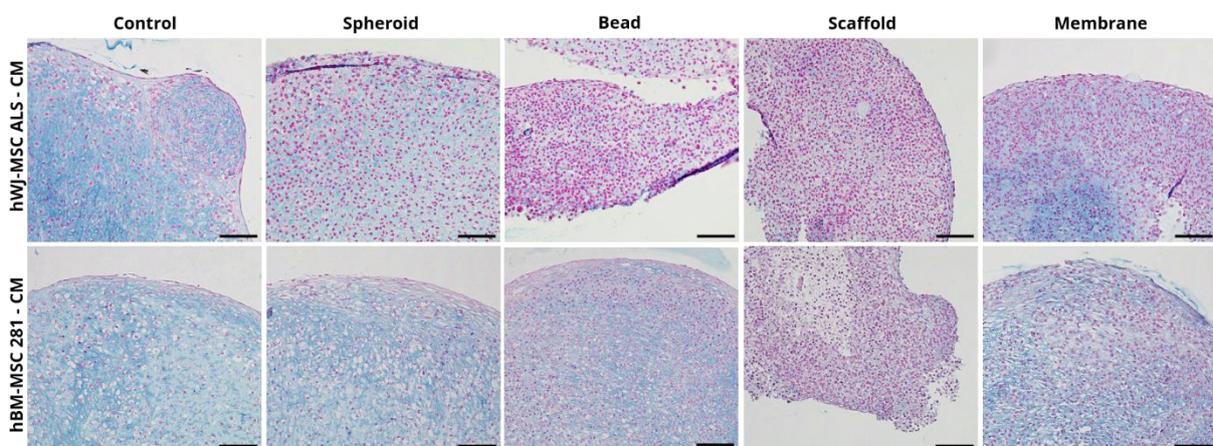


Abb. 13: Pellets des Spenders RES 5, die in Gegenwart von konditioniertem Medium von WJ- und BM MSC in den Applikationsmodellen 21 Tage kultiviert wurden, Alcianblau-Färbung von Paraffinschnitten, Maßbalken 200 µm

## Diskussion und Zusammenfassung

Im vorliegenden Projekt wurden MSC verschiedenen Ursprungs (Knochenmark und Nabelschnurgewebe) auf ihr Potential, die chondrogene (Re)differenzierung von humanen Chondrozyten zu unterstützen und antientzündlich zu wirken untersucht. Die in vitro Umgebung, in der die Experimente durchgeführt wurden, kann natürlich die in vivo Situation nur teilweise nachahmen. Wir konnten in unseren Experimenten die Stammzellen unstimuliert und chondrogen stimuliert kultivieren. Solch eine Trennung ist in vivo natürlich nicht möglich. Das von den MSC konditionierte Medium zeigte nur in wenigen Fällen eine Stimulation der chondrogenen Differenzierung und reichte nicht aus, die durch zugesetztes IL 1 $\beta$  hervorgerufene Entzündungsreaktion zu stoppen. Auch die Applikation der Stammzellen in den verschiedenen Modellen führte nicht zur erwarteten Stimulation der Chondrozyten. Hier sollten weitere Experimente durchgeführt werden, bei denen die Dichte der MSC in den Modellen deutlich erhöht ist. Erfreulich für die potentielle Applikation von WJ-MSC ist das Ergebnis, dass bereits nach kurzer Adhärenzzeit von 5 min die Zellen zumindest zum Teil so an der Membran angeheftet sind, dass auch nach intensivem Spülen noch Zellen auf der Kollagenmembran verblieben. Damit wäre eine klinische Studie mit WJ MSC, appliziert auf der ChondroGide® Membran machbar und anzustreben.

## Literatur:

- [1] Pustlauk W, Paul B, Brueggemeier S, Gelinsky M, Bernhardt A. Modulation of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in jellyfish collagen scaffolds by cell density and culture medium. *J Tissue Eng Regen Med* 2017;11:1710–22. <https://doi.org/10.1002/term.2065>.
- [2] Ta M, Venugopal, Balasubramanian, Sen Majumdar. Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. *Stem Cells Cloning Adv Appl* 2011:39. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S17548>.
- [3] Tesarova L, Jaresova K, Simara P, Koutna I. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Are Able to Use bFGF Treatment and Represent a Superb Tool for Immunosuppressive Clinical Applications. *Int J Mol Sci* 2020;21:5366. <https://doi.org/10.3390/ijms21155366>.
- [4] Ramasamy R, Tong CK, Yip WK, Vellasamy S, Tan BC, Seow HF. Basic fibroblast growth factor modulates cell cycle of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* 2012;45:132–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00808.x>.
- [5] Liu C-H, Wu M-L, Hwang S-M. Optimization of serum free medium for cord blood mesenchymal stem cells. *Biochem Eng J* 2007;33:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.08.005>.
- [6] Bartosh TJ, Ylöstalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:13724–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008117107>.