

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Ecology

Doktorský studijní program: Biologie
Ph.D. study program: Biology

Autoreferát dizertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Hormonálne aspekty regulácie parožného rastu
Hormonal aspects of antler growth regulation

Erika Kužmová

Školitel/Supervisor:

Prof. Ing. Luděk Bartoš, DrSc.

Praha, 2011

ABSTRAKT

Parohy jeleňov sú jediným kompletne sa regenerujúcim orgánom u cicavcov a záujem vedcov o ich využitie ako modelu rastu a vývoja kostí stúpa. V posledných rokoch sa ukázalo, že regenerácia parohov je iniciovaná z kmeňových buniek lokalizovaných v okostici pučnice. Následný rast parohu do dĺžky však prebieha v rastovom vrcholčeku. Len málo sa vie o endokrínnej stimulácii rastu parohu a už dlhé roky existuje nesúlad medzi *in vivo* a *in vitro* štúdiami. Ako druhotný sexuálny znak sú parohy úzko späté so sezónnymi hladinami cirkulujúceho testosterónu. Keďže sú jeho hladiny najnižšie práve v čase rastu parohov a mnohé *in vitro* štúdie poukazujú na stimulačný efekt inzulínu podobného rastového faktoru (IGF-1), viacerí odborníci sa prikláňajú k názoru že IGF-1 je “hormón stimulujúci rast parohov”.

Tento záver je ale v rozpore s výsledkami *in vivo* štúdií, ktoré ukazujú nevyhnutnosť testosterónu pre rast parohov aj v jeho nízkych koncentráciách, a taktiež s predchádzajúcim názorom, že testosterón by mal byť “hormón stimulujúci rast parohov”. Zamerali sme sa teda na overenie účinkov IGF-1 na parožné bunky. Uskutočnili sme sériu *in vitro* experimentov na parožných bunkách izolovaných z viacerých štádií rastových vrcholčekov parohov jeleňa európskeho (*Cervus elaphus*). Počas *in vitro* kultivácií sme sledovali vplyv rôznych faktorov ako sú deň odberu tkaniva, individualita jedincov, pasážovanie, koncentrácia bovinného séra a dĺžka experimentu na intenzitu proliferácie parožných buniek. Zistili sme, že všetky tieto faktory signifikantne ovplyvnili proliferáciu buniek a dokonca sa vplyvom týchto faktorov menila intenzita proliferácie odpovede buniek z jednotlivých jedincov, alebo na sledované hormóny. Bunky primárnych kultúr, kultivované v 10% bovinnom sére odobraté na 15. deň od zhodenia parožia proliferovali najintenzívnejšie. Ďalej sme sledovali účinky rôznych hormónov ako testosterónu, IGF-1 a estradiolu, ako aj účinok antisteroidov Cyproterón acetátu, Flutamidu a ICI 182,780 na proliferáciu parožných buniek. Žiadny z hormónov nevyvolával u buniek jednotnú proliferáciu, hoci testosterón a čiastočne aj estradiol v niekoľkých prípadoch proliferáciu stimulovali. Naše experimenty však nepotvrdili stimulačný účinok IGF-1. IGF-1 buď nemalo žiadny účinok, alebo proliferáciu vo viacerých prípadoch inhibovalo. Zo zmiešaných parožných bunkových kultúr sa nám podarilo izolovať STRO-1 pozitívne mezenchymálne kmeňové bunky. Žiaľ, pre hormonálne experimenty sa nám nepodarilo izolovať dostatočné množstvo týchto buniek. Napriek tejto skutočnosti, naše experimenty ukazujú, že pohlavné steroidy majú mitogénny vplyv na parožné bunky *in vitro*, a teda by mohli hrať dôležitú úlohu v stimulácii rastu parožia.

Výsledky, ktoré sme získali, sú v zhode s výsledkami mnohých iných fyziologických a behaviorálnych štúdií. Podporujú úlohu testosterónu vo fáze rastu parožia a ukazujú, že primárne kultúry pravdepodobne lepšie reprezentujú *in vivo* podmienky a procesy prebiehajúce v regenerujúcich sa parohoch.

ABSTRACT

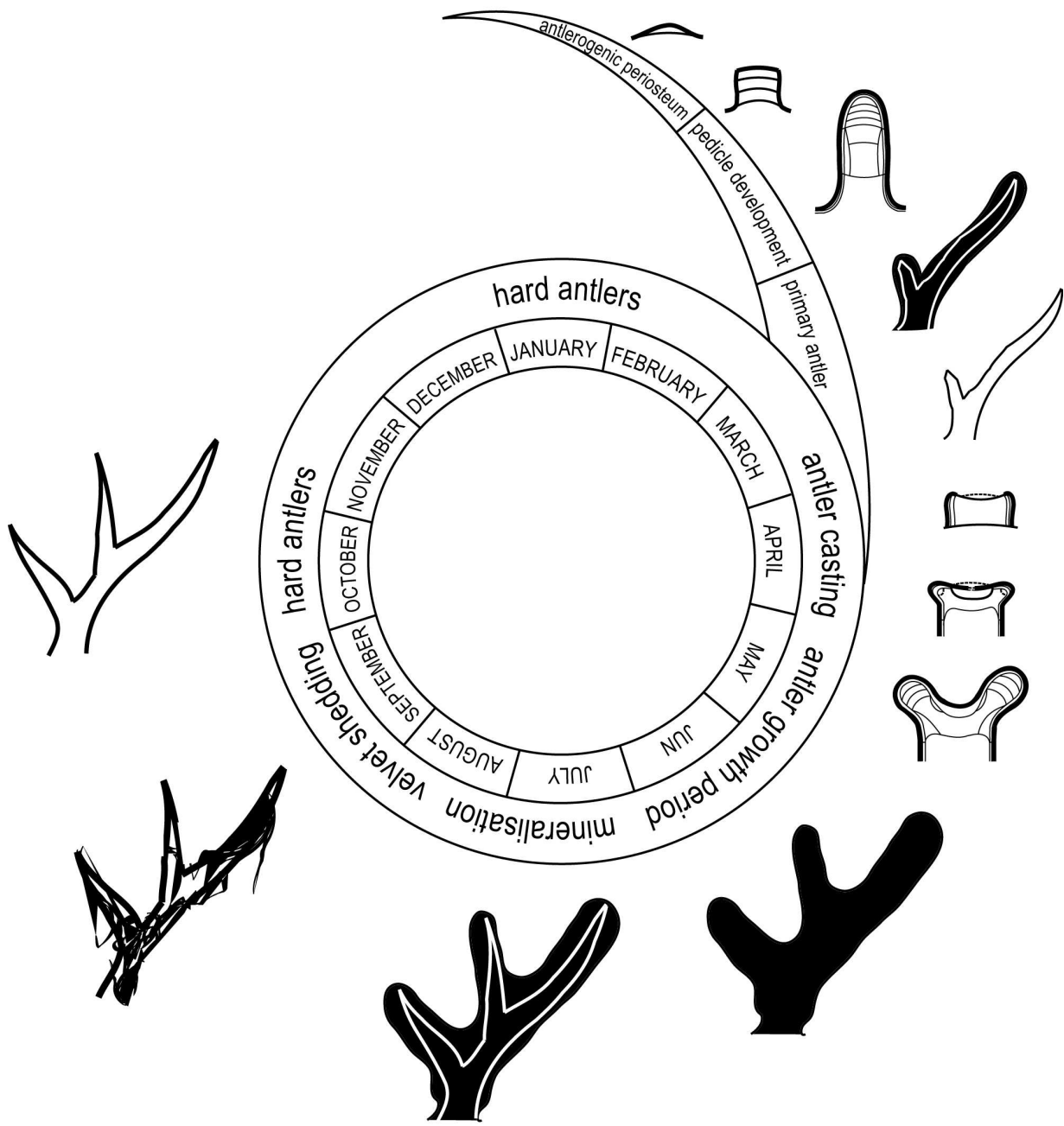
Deer antlers are the only mammalian organ that completely regenerates and therefore they became an object of rising interest as a potential model for bone growth and development. In recent years, it has been confirmed that annual regeneration of the antler is initiated from the stem cell niche localised in the pedicle periosteum. Antlers grow to the length at the tip. Only a little is known about endocrine stimulation of antler growth and some discrepancy has arisen between *in vivo* and *in vitro* studies over the decades. As the secondary sexual character, the antler cycle timing and growth are linked to seasonal levels of testosterone. Since the levels are at their minimum during the antler growth phase, according to many mainly *in vitro* studies, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) tends to be accepted as the “antler stimulating hormone”.

Since the conclusion about the role of IGF-1 was contradictory to previous opinions and also in contrast with our own experience, we aimed to verify the role of IGF-1 *in vitro*. Our experiments were based on existing *in vivo* studies demonstrating the importance of testosterone, even in its low levels, and on the hypothesis that testosterone should be the “antler stimulating hormone”. We performed *in vitro* experiments on cells derived from the growing antler tips of the red deer (*Cervus elaphus*) at various antler growth stages. Within *in vitro* cultivations we studied the effects of different factors such as antler sampling day, male individuality, passaging, concentration of foetal calf serum (FCS) and length of the experiment on the intensity of the antler cell proliferation. We found that all these factors not only significantly influenced the cell proliferation, but depending on these factors the intensity of proliferative response of cells from different individuals or under hormonal treatments was significantly changed. Next we studied the effects of various hormonal treatments as testosterone, IGF-1 and estradiol, as well as effect of antisteroids Cyproterone acetate, Flutamide and ICI 182,780, on antler cell proliferation. None of the treatments caused consistent proliferative response. However, testosterone and, partially, estradiol stimulated the proliferation in several cases. On the other hand, the stimulating effect of IGF-1 was not confirmed in our experiments, as IGF-1 either did not affect the antler cell proliferation or even inhibited it in some cases. We isolated STRO-1 positive mesenchymal stem cells from the mixed antler cell cultures but we could not perform hormonal experiments with the cells, as we were unable to obtain sufficient amounts of the positive cells for our experiments. Despite this, our results suggest that the sex steroids are mitogenic for antler cells *in vitro* and might play an important role in the stimulation of antler growth.

Our results are in accordance with many physiological and behavioural studies. They support the inevitable role of testosterone in the antler re-growth phase and suggest that the primary cultures may better represent the *in vivo* conditions and processes that occur in regenerating antlers.

OBSAH / CONTENTS

1 Úvod	5
2 Ciele Práce	6
3 Materiál a Metodika	6
4 Výsledky a Diskusia	7
5 Závery	12
1 Introduction	13
2 Aims of the Study	14
3 Materials and Methods	14
4 Results and Discussion	15
5 Conclusions	20
References	21
Curriculum Vitae	25
Selected publications	26



Parožný cyklus / Antler cycle

1 ÚVOD

Parohy sú druhotným pohlavným znakom čeľade jeleňovitých. Okrem samíc soba polárneho sa vyskytujú len u samcov jeleňovitých. Keďže parohy hrajú dôležitú úlohu v sociálnych interakciách jeleňov, najmä v období ruje, parožný cyklus je úzko spätý so sezónnym kolísaním pohlavných hormónov [1]. Pohlavné hormóny, najmä testosterón, sú nevyhnutné pre vývoj pučnice, prvotných parohov a pre časovanie každoročne sa opakujúcich procesov parožného cyklu [2, 3]. Vysoké koncentrácie testosterónu koncom leta spôsobujú mineralizáciu parohov a vytĺkanie lyka. Pokles hladiny testosterónu na jar spôsobí zhadzovanie parožia. Počas rastu parohov sú však sezónne hladiny testosterónu minimálne, a preto mnohí autori zastávajú názor, že v procese rastu testosterón nehrá úlohu [4]. Na základe výsledkov *in vivo*, ale najmä *in vitro* štúdií parožných buniek, sa všeobecne akceptovaným “hormónom stimulujúcim rast parohov” stal IGF-1 [3–5]. Avšak existuje dostatok experimentálnych dôkazov, ktoré podporujú nevyhnutnú úlohu testosterónu pre rast parožia aj pri nízkych koncentráciách [6–8]. Tento nesúlad existuje už desaťročia a stále nebol dostatočujúco objasnený. Celkovo sa vie stále iba málo o endokrinnej stimulácii rastu parožia a najmä aktivácii parožných progenitorových buniek v okostici pučnice [9].

Napriek mnohým pozoruhodným vlastnostiam regenerujúcich sa parohov, je ich výskum iba na začiatku a je potrebné riešiť mnohé základné problémy spojené s *in vitro* štúdiom parohov. Regenerácia parožia je komplexný dynamický proces a mnohé faktory by mohli mať veľký význam, dokonca aj v *in vitro* podmienkach. Niektoré z nich, ako deň odberu tkaniva od zhodenia parohov, individualita jedincov, ako aj faktory kultivačných podmienok neboli dostatočne preskúmané a zohľadnené v doterajších štúdiách [10–13]. Navyše väčšina doterajších *in vitro* experimentov bola robená na zmiešaných kultúrach, ktoré pozostávajú z buniek v rôznom štádiu diferenciácie a ich pomer sa môže líšiť v každej jednej kultúre. Spôsob, ako sa vyrovnáť s týmito problémami, by mohli vyriešiť experimenty na presne definovaných bunkových populáciách namiesto zmiešaných parožných kultúr. Takéto pokusy po prvýkrát zrealizovali Rolf a kol. [14], ktorí izolovali a kultivovali tzv. “čisté STRO-1 pozitívne mezenchymálne kmeňové bunky” získané z okostice pučnice a parožného rastového vrcholčeku. Multipotentnosť týchto buniek bola dokázaná ich diferencovaním v *in vitro* podmienkach na bunky kostnej a chrupavkovej línie, ako aj na tukové bunky, ktoré sa v parožnom tkanive nevyskytujú [14]. Prevedenie hormonálnych experimentov na takýchto bunkách by malo veľký význam pri zodpovedaní otázky ohľadom “hormónu stimulujúceho rast parohov”. Na druhej strane si myslíme, že “hormón stimulujúci rast parožia” by mal byť mitogénny pre parožné bunky, nezávisle na zmene kultivačných podmienok, alebo od individuality jedinca, či dňa odberu tkaniva.

Uskutočnili sme sériu *in vitro* experimentov na zmiešaných kultúrach parožných buniek. Sústredili sme sa najmä na proliferačnú odpoveď týchto buniek, hlavne na hormóny testosterón a IGF-1, o ktorých sa vedie spor, ktorý z nich je “hormón stimulujúci rast parohov”, ako aj na faktory, ktoré by potenciálne mohli ovplyvniť proliferáciu parožných buniek v *in vitro* podmienkach.

2 CIELE PRÁCE

Predkladaná štúdia sa zaoberá *in vitro* experimentmi na parožných bunkách získaných z rastových vrcholčekov parohov v rôznych štádiách vývoja parohu. Ciele boli:

1. Preskúmať faktory, ktoré ovplyvňujú proliferáciu parožných buniek *in vitro*.
2. Zistiť, aká je proliferačná odpoveď zmiešaných parožných bunkových kultúr na vybrané hormóny a rastové faktory (najmä testosterón, estradiol a IGF-1), samostatne alebo v spolupôsobení s antiandrogénmi - cyproterón acetátom, flutamidom a antiestrogénom ICI 182,780 - v meniacich sa podmienkach experimentu.
3. Izolovať mezenchymálne kmeňové bunky zo zmiešaných parožných bunkových kultúr a vykonať hormonálne experimenty na "čistých" populáciách parožných kmeňových buniek.

3 MATERIÁL A METODIKA

V experimentoch sme použili parožné tkanivo, ktoré bolo získané z rastúcich parohov ôsmich samcov farmovo chovaného jeleňa európskeho (*Cervus elaphus*), jelene boli vo veku dva až tri roky. Vzorky sa odoberali na 15-ty, 30-ty a 60-ty deň od zhodenia predchádzajúceho parožia. Jelene sa uspali a z vydezinfikovaných rastových vrcholčekov parohov sa vo vzdialenosti približne 0.5-1 cm a 2 cm od vrcholu, pomocou bioptickej ihly, odobralo tkanivo zodpovedajúce mezenchymálnej zóne nediferencovaných intenzívne proliferujúcich sa buniek a zóne (pre)chrupavky [3, 15]. Vzorky boli spracované do 30 minút od odberu. Tkanivo bolo, buď zmrazené v 10% dimetylsulfoxide (DMSO) a v 90% bovinnom sére, alebo rozrezané na 0.5–1 mm³ kúsky. Kúsky boli 4 hodiny inkubované v štandardnom médiu DMEM/F12 1:1 s obsahom 1% penstrepu, 1% ITS, 0,1% gentamycínu a s 200 U/ml kolagenázy typu II. pri teplote 37°C a vortexované každých 20 minút. Získané bunky boli okamžite preosiate cez špeciálne sitko a hneď nasadené do experimentu ako primárne kultúry, kultivované po druhú pasáž, ktorá bola nasadená do experimentov, alebo obe zamrazené v 10% DMSO a 90% bovinnom sére.

Hormonálne experimenty boli robené na primárnych a dvakrát pasážovaných zmiešaných parožných kultúrach v 1%, alebo 10% bovinnom sére. Proliferačia buniek sa merala po 24, 2x24 a 6x24 hodinách pôsobenia hormónov. Boli použité nasledovné koncentrácie hormónov: testosterón (T) 1 nM, 10 nM; inzulínu podobný rastový faktor (IGF-1) 6.5 nM a 13 nM; kombinácie testosterónu a IGF-1; 17 β -estradiol (E) 1 nM, 10 nM, ako aj cyproterón acetát 100 nM, flutamid 100 nM a antiestrogén ICI 182,780 100 nM, v rôznych kombináciách. Kontrola (C) bola vždy rovnaká procedúra bez pridania hormónu. Na určenie proliferačného potenciálu buniek sa 16 hodín pred ukončením kultivácie do každej kultúry pridal ³H tymidín (Methyl-³H tymidín, s. a. 6–7 Ci/mmol) vo výslednej koncentrácii 1 mCi/ml. DNA syntéza bola meraná na základe inkorporácie trícium značeného tymidínu za použitia techniky TCA precipitácie a tekutého scintilačného merania, ako popísali Vacková a kol. [16].

Na separáciu mezenchymálnych kmeňových buniek sme použili zmrazené tkanivo a bunky získané z jeleňa. Pre účely štatistickej analýzy faktorov ovplyvňujúcich počty mezenchymálnych kmeňových buniek, v zmiešaných kultúrach parožných buniek pred separáciou, sme analyzovali 58 MACS[®] separačných procedúr pre jeleňa a 130 MACS[®] pre daniela (*Dama dama*). Analyzované kultúry buniek danielov boli získané zo štyroch samcov farmovo chovaných danielov škrvnitých, vo veku dva až šesť rokov. Vzorky boli odobraté na 30-ty až 90-ty deň od zhodenia parožia. Pre účely odberu tkaniva boli daniely zabití. Vzorky boli odobraté 1-2 cm od rastového vrcholčeku, a okrem toho, aj z kosti parohu, periosteum parohu a periosteum pučnice. Získané tkanivo bolo rozrezané na kúsky veľkosti 0.5–1 mm³. Následne sa nechali vyrastať bunky z týchto kusov až kým nedosiahli konfluenciu. Bunky danielov boli kultivované až po siedmu pasáž v DMEM s 10% bovinným sérom v štandardizovaných laboratórnych podmienkach (37°C a 5% CO₂). Zo všetkých pasáží buniek jeleňov a danielov boli STRO-1 pozitívne mezenchymálne kmeňové bunky izolované nasledovným spôsobom. Zmiešané bunkové kultúry boli označené primárnou protilátkou voči povrchovému antigénu STRO-1, na ktorú sa naviazala sekundárna protilátka IgG-MicroBeads, a separované pomocou MACS[®] procedúry, podľa protokolu odporúčaného výrobcom. Bunky boli spočítané, pred a po MACS[®] separácii, pomocou prístroja CASY. Všetky MACS[®] separácie boli uskutočnené v tom istom laboratóriu, v rámci dlhodobého výskumu parožných kmeňových buniek. Faktory, ktoré sme analyzovali, boli: miesto odoberania vzoriek (na parohu, alebo pučnici), pasáž (0-7) a typ kultúry (zmiešaná, alebo následne kultivovaná STRO-1 negatívna kultúra).

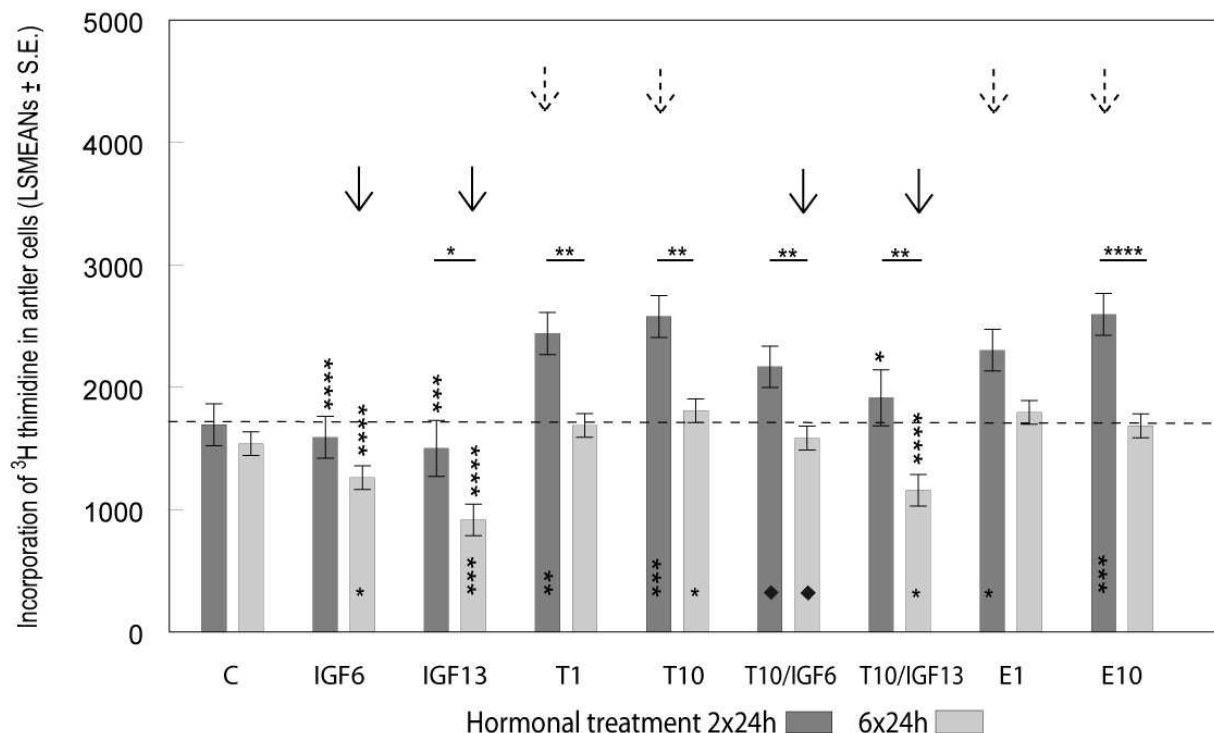
Štatistická analýza, ktorou boli vo všetkých prípadoch výsledky spracované, používa "General Linear Mixed Model" (GLMM). Model využíva PROC MIXED procedúru (SAS V9.0 a 9.1), metódu najmenších štvorcov (LSMEANS) a Tukey-Kramer-ovu úpravu pre viacnásobné porovnania. Význam fixného efektu v GLMM modeli bol odhadnutý F-testom a rozdiely medzi triedami boli testované t-testom.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

V našich experimentoch sme sa najprv zamerali na faktory a hormóny, ktoré ovplyvňujú proliferáciu zmiešaných buniek parožných kultúr *in vitro*.

Zistili sme, že intenzita proliferácie *in vitro* kultivovaných parožných buniek závisela od všetkých sledovaných faktorov, a to: od individuality jedinca ($P < 0.0001$), pasáže ($P < 0.0001$) a ako sme očakávali, od koncentrácie bovinného séra ($P < 0.0001$) [17] (článok I). Pri porovnaní proliferácie pasážovaných bunkových kultúr z 30-teho a 60-teho dňa odberu po zhodení predchádzajúceho parožia, sme medzi týmito dvoma odbermi nezistili žiadny rozdiel [17] (článok I). Naopak, pri porovnaní primárnych kultúr, z jednotlivých dní odberu na 15-ty, 30-ty a 60-ty deň, sme zistili vysoké, signifikantné rozdiely, pri kultivácii v 1% aj 10% bovinnom sére ($P < 0.0001$ pre obe koncentrácie) [34] (článok III). Intenzita proliferácie závisela tiež na dĺžke experimentu ($P < 0.0001$) [34] (článok III). Vo všeobecnosti, vyššia koncentrácia séra (10%) zvýrazňovala inter-individuálne rozdiely medzi bunkami z jednotlivých jeleňov, ktoré boli zjavné už

pri použití 1% séra, zatiaľ čo po pasážovaní sa zmenil pomer intenzity proliferácie medzi jedincami [17] (článok I). Na druhej strane, proliferačná odpoveď kultivovaných buniek na hormóny signifikantne varíovala v závislosti na pasáži, dĺžke experimentu a dni odberu tkaniva. Obrázok 1 ukazuje rozdielny účinok hormónov na proliferáciu buniek v závislosti na dĺžke experimentu, a teda pôsobení hormónu (Obr.1).



Obr. 1: Účinok testosterónu, IGF-1 a estradiolu na proliferáciu pasážovaných zmiešaných buniek parožných kultúr odobratých na 30-ty a 60-ty deň, kultivovaných v 1% sére po 2x24 a 6x24 hodinovom pôsobení hormónov. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Hviezdičky nad vodorovnými čiarami reprezentujú rozdiely medzi 2x24 a 6x24 hodinovým pôsobením hormónu. Hviezdičky vo vnútri stĺpcov reprezentujú signifikantný rozdiel od kontroly. Hviezdičky nad stĺpcami reprezentujú signifikantný rozdiel od 10nM T. Píky vo vnútri stĺpcov reprezentujú signifikantný rozdiel od 6nM IGF-1. Uvedené sú len zmysluplné signifikancie, týkajúce sa našich experimentov, $n \geq 15$ [34] (článok III).

Ako bude popísané nižšie, zo zmiešaných bunkových parožných kultúr sa nám podarilo izolovať značné množstvá mezenchymálnych kmeňových buniek (až 38,9% z kultúr daniela a 16,5% z kultúr jeleňa). To nám aspoň čiastočne dovoľuje porovnať naše kultúry s charakteristikami kultúr iných mezenchymálnych kmeňových buniek. Niekoľko štúdií popisuje tiež veľkú inter-individuálnu variabilitu v proliferácii ovčích a králičích mezenchymálnych kmeňových buniek [19, 20]. Podobne, pasáž a percento séra hrajú veľkú úlohu a mnohé štúdie ukazujú, že ich vplyvom sa môže zásadne meniť charakter a expresia kultivovaných buniek [21–24]. Usudzujeme preto, že bez ohľadu na to, či boli samotné experimenty robené za prítomnosti séra,

alebo v podmienkach bez prítomnosti séra, už prekultivácia v 10% sére môže ovplyvniť napr. proliferačnú odpoveď buniek na hormóny. Podľa nás, primárne kultúry, bez pasážovania a prekultivácie, za prítomnosti séra, lepšie reprezentujú *in vivo* podmienky a procesy prebiehajúce v regenerujúcom sa paroží [17] (článok I).

Na základe týchto konštatovaní sme robili hormonálne experimenty na primárnych aj pasážovaných bunkách [34] (článok III). Proliferačia buniek bola veľmi variabilná a žiadny hormón nemal na proliferáciu buniek jednotný účinok. V experimentoch s pasážovanými bunkami mali testosterón, estradiol a IGF-1 dvojaký účinok, v závislosti na dĺžke experimentu, a teda dĺžke pôsobení hormónu (Obr.1). Zatiaľ, čo testosterón a estradiol signifikantne stimulovali proliferáciu parožných buniek v oboch koncentráciách (1nM T: $P < 0.01$; 10nM T: $P < 0.001$; 1nM E: $P < 0.05$; 10nM E: $P < 0.001$; Obr.1 šípky prerušovanou čiarou) pri krátkom, 2x24 hodinovom, pôsobení hormónov, IGF-1 nemal žiaden účinok. Naopak, pri dlhšom, 6x24 hodinovom, pôsobení hormónov, testosterón a estradiol mali len slabý účinok (10nM T: $P < 0.05$), ale IGF-1 signifikantne inhiboval proliferáciu parožných buniek v oboch koncentráciách, v porovnaní s kontrolou (6nM IGF: $P < 0.05$; 13nM IGF: $P < 0.001$; Obr.1 šípky plnou čiarou). IGF-1 zároveň signifikantne inhiboval stimulačný účinok testosterónu, ako je ukázané na obrázku 1 (10nM T/13nM IGF: $P < 0.05$).

V experimentoch bez prekultivácie, účinok hormónov výrazne závisel na dni odberu tkaniva a bol celkovo menej výrazný v porovnaní s účinkom na pasážovaných bunkách. Testosterón signifikantne stimuloval proliferáciu buniek len na 15-ty deň odberu parožného tkaniva (1nM T: $P < 0.05$, 10nM T: $P < 0.01$). Estradiol inhiboval bunky len na 30-ty deň (10nM E: $P < 0.05$), zatiaľ čo IGF-1 nemalo žiadny efekt na proliferáciu. Avšak opäť, spolupôsobenie testosterónu s IGF-1 signifikantne inhibovalo stimulačný účinok testosterónu, ale iba u buniek odobratých na 15-ty deň od zhodenia parožia (1nM T/6nM IGF: $P < 0.05$, 10nM T/6nM IGF: $P < 0.01$). Účinok antisteroidov samotných, ako aj v kombinácií so steroidmi, či IGF-1 bol nekonzistentný.

Čo sa týka testosterónu a estradiolu, naše výsledky sa zhodujú s pozorovaním Price-ovej a kol.[3], ktorá vo svojej práci uvádza, že aj testosterón, aj estradiol, spôsobujú proliferáciu parožných buniek, aj keď tá sa zdá byť závislá na štádiu parohov a štádiu diferenciácie buniek. Štúdia, Rolfa a kol. [10], tiež potvrdzuje mitogénny účinok testosterónu na parožné bunky *in vitro*. Na druhú stranu, naše experimenty nepotvrdili mitogénny účinok IGF-1 na parožné bunky, uvádzaný inými autormi [11–13]. Navyše, IGF-1 v niekoľkých prípadoch, na rozdiel od Sadighi-ho a kol. [13], inhiboval mitogénny účinok testosterónu. Sadighi et al. [13] na základe svojich výsledkov vyvodil, že testosterón nesenzitivizuje parožné bunky na proliferačný účinok IGF-1. Napriek tomu, že ani Sadighi, a ani my, sme markery diferenciácie nesledovali, testosterón by mohol senzitivizovať bunky, nie na mitogénny, ale diferenciálny vplyv IGF-1, ako sa uvádza pre ostatné kostné tkanivo [25, 26]. V súlade s týmto pohľadom Elliott a kol. [27] uvádza, že IGF-1 spôsobuje v rastúcich parohoch predovšetkým diferenciáciu buniek. Lokalizoval receptory pre IGF-1 v zóne chondroblastov rastúcich parohov, čo naznačuje úlohu IGF-1 v matrixogéneze, a teda pri tvorbe chrupavky. Podľa Elliota neexistuje žiadny dôkaz, ktorý by podporoval hlavnú úlohu IGF-1 v mitóze parohov. V skutočnosti, ani Colitti-ová a kol. [28]

vo svojej štúdií o parohoch, nedetekovala žiadnu mitotickú aktivitu v zóne progenitorov chrupavky (pre-chrupavky) a ani v zóne chrupavky. Na druhú stranu, estrogénové receptory [29], a pravdepodobne aj androgénové receptory [30], boli nájdené vo fibróznom perichondriu, ktoré je mitoticky aktívne [28].

Nesúlad medzi *in vitro* štúdiami však môže byť spôsobený aj už vyššie spomenutými faktormi. Všetky predchádzajúce *in vitro* experimenty na parožných bunkách boli prevedené po prekultivácii v 10% bovinnom sére a/alebo boli bunky získané až na 60-ty deň od zhodenia parožia. Okrem toho, prevedenie experimentov v čiastočne bezsérových podmienkach, alebo pri nízkych koncentráciách séra, môže spôsobiť dokonca opačnú odpoveď. Napríklad Patel a kol. [22] vo svojich experimentoch ukázali, že u buniek izolovaných z pulpálneho tkaniva sa po pasážovaní a následnej kultivácii prehlbovali rozdiely voči primárnym kultúram. Podľa týchto autorov sú takéto kultúry tvorené najmä bunkami adaptovanými a/alebo vyselektovanými na základe zvýšenej schopnosti prispôbiť sa kultivačným podmienkam a kultivačnému plastiku. Ďalším dôležitým faktorom na ktorý nemôžeme zabúdať je, že všetky doterajšie hormonálne experimenty, vrátane našich, boli prevedené na zmiešaných bunkových kultúrach. Tieto kultúry pozostávajú z nediferenciovanej progenitorových buniek, ako aj progenitorových buniek, v rôznych štádiách diferenciácie na bunky chrupavky, alebo kosti. Takéto zmiešané kultúry môžu dávať odlišné výsledky v závislosti od pomeru zastúpených buniek. Keďže pohlavné hormóny, ako aj IGF-1, majú aj mitogénny, aj diferenciačný efekt na bunky kostného tkaniva, v závislosti od štádia diferenciovateľnosti buniek [31–33], toto vysvetlenie nesúladu medzi *in vitro* štúdiami je asi najpravdepodobnejšie.

Ak je obnova parohov spôsobená reaktiváciou kmeňových buniek v periosteu pučnice a paroh rastie na vrcholčeku, kde intenzívne proliferujú progenitorové bunky, potom hormonálne experimenty uskutočnené na takýchto bunkách by mali veľký význam z hľadiska zodpovedania otázky ohľadom “hormónu stimulujúceho rast parožia”. Preto sme sa v našich ďalších experimentoch sústredili na izoláciu mezenchymálnych kmeňových buniek, ktoré sú pozitívne na povrchový antigén STRO-1, zo zmiešaných buniek parožných kultúr. STRO-1 pozitívne bunky sú pravdepodobne jednou z najdôležitejších bunkových populácií, z ktorých vznikajú progenitory chrupavky a kosti [18] (článok II). Množstvo získaných STRO-1 pozitívnych buniek však veľmi varíovalo, od 0.4% do 38.9% u danielov, a od 1.8% to 16.5% u jeleňov. Žiaľ, nepodarilo sa nám izolovať dostatočné množstvo pozitívnych buniek na prevedenie rozsiahlych hormonálnych experimentov, a ani ich spoľahlivo expandovať za zachovania ich nediferencovaného potenciálu. Preto sme sa rozhodli analyzovať faktory ovplyvňujúce vysokú variabilitu počtu získaných STRO-1 pozitívnych buniek. Prvým faktorom bol typ bunkovej kultúry, a to buď zmiešaná, alebo následne kultivovaná negatívna kultúra po sortovaní buniek. Ako uvádzajú už aj Stewart a kol. [35], STRO-1 pozitívne bunky je možné, a nám sa tiež podarilo, izolovať aj z niekoľkonásobne sortovaných a kultivovaných STRO-1 negatívnych buniek. Takže STRO-1 pozitívne bunky musia vznikáť zo STRO-1 negatívnych kultúr. Jedno z vysvetlení je, že sa v kultúrach nachádzajú skoršie štádia prekursorových buniek, ktoré po čase dozrejú a stanú sa pozitívne na povrchový STRO-1 antigén. Ďalšie vysvetlenie je, že naša metóda nebola dost

citlivá na izoláciu buniek s menším počtom povrchového antigénu, ktorého množstvo vzrastá počas kultivácie. Typ kultúry bol signifikantným faktorom pre jelene ($P < 0.05$) aj daniela ($P < 0.0001$), ale výsledky sa líšili. Zatiaľ, čo u danielov sme izolovali signifikantne vyššie množstvo STRO-1 pozitívnych buniek zo zmiešaných kultúr v porovnaní so STRO-1 negatívnymi kultúrami, u buniek z jeleňov to bolo naopak. Okrem typu kultúry sme analyzovali miesto odberu a vplyv pasáže. Nezistili sme žiadny signifikantný vplyv miesta odberu tkaniva z parohu, alebo pučnice. Je preto pravdepodobné, že proces kultivácie ovplyvňuje množstvo vyizolovaných STRO-1 pozitívnych buniek natoľko, že prekrýva vplyv očakávaných faktorov, ako napr. miesta odberu, najmä u buniek z perioste pučnice, ktoré je považované za iniciačné tkanivo pre obnovu parohov [36]. Naopak pasáž mala signifikantný vplyv na množstvo izolovaných STRO-1 pozitívnych buniek aj pre kultúry z jeleňa, aj z daniela (jeleň $P < 0.001$, daniel $P < 0.0001$). Celkovo boli najvyššie množstvá pozitívnych buniek získané z druhej pasáže, zhodne pre jeleňa ($5.5\% \pm 3.03$), aj pre daniela ($24.6\% \pm 14.37$). Keďže pozitívne bunky rýchlo po sortrovaní diferencovali, zvýšené množstvá pozitívnych buniek izolovaných z druhej pasáže si vysvetľujeme prítomnosťou buniek v rôznych štádiách expresie povrchového markeru STRO-1, a kontinuálne sa meniacim multipotentným potenciálom a diferenciáciou buniek [35, 37, 38]. Simmons a Torok-Storb [39] popísali podobný jav signifikantného zvýšenia množstva STRO-1 pozitívnych buniek po dvoch týždňoch kultivácie, ktorý bol nasledovaný ich prudkým poklesom. Podľa ich názoru ide o epifenomén kultivácie, ktorý nemá nič spoločné s *in vivo* podmienkami, alebo tento jav vzniká dozrievaním stromálnych prekursorov na diferencovanejšie štádia, ako bolo rozoberané už vyššie. Naša analýza ukazuje, že manipuláciou kultivačných faktorov môžeme zväčšiť množstvá vyizolovaných STRO-1 pozitívnych buniek.

Opäť sa však ukazuje, že kultivačné faktory môžu signifikantne ovplyvniť kultúry parožných buniek *in vitro* a prekryť faktory, ktoré ovplyvňujú rast parohu *in vivo*. Toto sa ukázalo aj v našom prípade pri vplyve miesta odberu, dňa odberu tkaniva od zhodenia parohov a pri individualite jedincov.

Posledný článok dizertačnej práce [8] (článok IV) je preľadová štúdia zaoberajúca sa endokrinnými aspektami vzťahu medzi vývojom parohu a dominantným správaním. V článku analyzujeme argumenty za a proti úlohe testosterónu a IGF-1 v raste parohov a porovnávame výsledky štúdií na viacerých druhoch jeleňovitých. Na základe našej analýzy usudzujeme, že nie IGF-1 ale testosterón je stimulačným a regulačným hormónom parožného rastu v *in vivo* štúdiách.

5 ZÁVERY

Naše experimenty potvrdili signifikantný vplyv faktorov deň odberu tkaniva, individualita jedinca, pasáž, percento bovinného séra a dĺžka experimentu (pôsobenia hormónu), na proliferáciu parožných buniek *in vitro*. Faktory kultivácie, najmä pasáž, mali významný vplyv aj na množstvo izolovaných kmeňových buniek získaných zo zmiešaných bunkových parožných kultúr.

Proliferačná odpoveď parožných buniek na pôsobenie hormónov sa významne menila v závislosti na uvedených faktoroch. Zistili sme signifikantný rozdiel v proliferačnej odpovedi parožných buniek vplyvom dvoch sledovaných koncentrácií bovinného séra. Pri vyššej koncentrácii bola intenzita proliferácie vyššia, a v prípade účinku niektorých hormónov dokonca opačná, v porovnaní s nízkou koncentráciou séra. Podobný rozdiel sme zistili aj medzi primárnymi a pasážovanými bunkami. Čo sa týka dňa odberu parožného tkaniva, bunky odobraté na 15-ty deň od zhodenia parožia proliferovali najintenzívnejšie. V našich experimentoch sme nepozorovali žiadny konzistentný účinok ani jedného zo sledovaných hormónov, či rastového faktoru. Celkovo testosterón stimuloval, alebo nemal vplyv na proliferáciu parožných buniek. Naopak IGF-1, buď nemalo vplyv, alebo proliferáciu buniek inhibovalo. Účinok antisteroidov a estradiolu bol veľmi nejednotný. Žiaľ, nepodarilo sa nám izolovať dostatočné množstvo kmeňových buniek zo zmiešaných bunkových parožných kultúr na uskutočnenie hormonálnych experimentov a ani ich expandovať pri zachovaní ich nediferencovaného potenciálu. Bez ohľadu na túto skutočnosť, naše výsledky naznačujú, že pohlavné hormóny hrajú dôležitú úlohu v stimulácii rastu parohov, ale ich efekt sa zdá byť závislý na čase a štádiu rastu parohu. Nepodarilo sa nám ale potvrdiť mitogénny účinok IGF-1 *in vitro* popísaný inými autormi [11–13]. Naše výsledky sú však v súlade s mnohými fyziologickými a behaviorálnymi štúdiami a podporujú nevyhnutnú úlohu testosterónu vo fáze rastu parohu [8]. Okrem toho, naše výsledky naznačujú, že primárne kultúry lepšie reprezentujú *in vivo* podmienky a procesy prebiehajúce v regenerujúcich sa parohoch.

Myslíme si, že testosterón by mohol byť “hormónom stimulujúcim rast parohov”, avšak kvôli mnohým faktorom, ktoré ovplyvňujú proliferáciu parožných buniek *in vitro* a tomu, že výskum rastu parohov je stále iba na začiatku, je potrebné uskutočniť ďalšie a detailnejšie experimenty, ktoré by potvrdili túto hypotézu.

1 INTRODUCTION

Antlers are a secondary sexual character unique to cervids. Except of female reindeer they can be found only in males. Since they play an important role in the social interactions of deer during the breeding period, the antler cycle is linked to the seasonal fluctuation of sex hormones [1]. Sex steroids, particularly testosterone, are required for pedicle and primary antler development and are the most important for the timing of the annual events in the antler cycle [2, 3]. High levels of testosterone cause antler mineralization and velvet shedding in the late summer and the rapid decline of testosterone levels in the spring cause antler casting. During antler growth, the systemic levels of testosterone are at their minimum and therefore many authors suppose that they play only a minor role [4]. Supported by *in vivo*, but especially by *in vitro* studies on antler cells, IGF-1 became widely accepted as the antler stimulating hormone [3–5]. However, there is experimental evidence supporting the importance of testosterone for antler growth even in its low levels [6–8]. This discrepancy has not been settled over decades. Generally, only a little is known about the endocrine stimulation of the antler re-growth and the activation of the antler progenitor cells in the pedicle periosteum [9].

Despite many extraordinary characteristics that the regenerating antlers possess, their research is in its beginning, and many basic problems connected to *in vitro* antler study are needed to be solved. Antler regeneration is a complex dynamic process and many factors might be of high importance even under *in vitro* conditions. Several of them such as tissue sampling day or animal individuality as well as factors of culture conditions have not been satisfactorily investigated or taken into account in existing studies [10–13]. Moreover, most of the *in vitro* experiments so far have been performed on the mixed antler cultures which consist of cells in different stages of their differentiation and their ratio may vary from culture to culture. One way to overcome some of the above mentioned problems would be to use a well defined cell population instead of mixed antler cell populations. Such attempts were for the first time performed by Rolf et al. [14] and resulted in isolation of “pure STRO-1+ mesenchymal stem cell cultures” derived from pedicle periosteum or regenerating antler tip. Undifferentiated potential of these cells has been demonstrated by differentiation along osteogenic, chondrogenic and with antler tissue unrelated adipogenic lineages *in vitro* [14]. Hormonal experiments performed on such cells would be of high significance in answering the question of “antler stimulating hormone”. On the other hand, the “antler stimulating hormone” should be mitogenic for the antler cells *in vitro* independently of culture conditions, male individuality or sampling day.

We performed *in vitro* experiments with antler cells. We primarily concentrated on proliferative response of these cells to the main hormones of the “antler stimulating hormone” controversy, to testosterone and IGF-1 and the factors potentially influencing the antler cell proliferation *in vitro*.

2 AIMS OF THE STUDY

The presented work deals with the *in vitro* experiments on cells derived from growing antler tips at various antler growth stages. The aims of the study were:

1. To investigate factors influencing antler cell proliferation *in vitro*.
2. To examine the proliferative response of mixed antler cell populations to hormonal and growth factor treatments (particularly to testosterone, estradiol and IGF-1) alone or in the co-treatment with antiandrogens cyproterone acetate and flutamide and antiestrogen ICI 182,780 under varying experimental design.
3. To isolate mesenchymal stem cells out of mixed antler cell cultures and to perform hormonal experiments with the “pure antler stem cell populations”.

3 MATERIALS AND METHODS

Antler tissue was collected from growing antlers of eight farmed red deer males (*Cervus elaphus*) aged between two to three years. Sampling was performed on the 15th, 30th and 60th day after the previous set of antlers had been cast. For sampling purposes the red deer males were fully anesthetized and the growing tips of regenerating antlers were superficially cleaned with disinfection. A biopsy was taken with a trephine punch approximately 0.5–1.0 cm and 2 cm from the antler tip corresponding to the mesenchymal zone of the most intensively proliferating undifferentiated cells and to the precartilage/cartilage zones [3, 15]. The obtained tissue was processed within 30 minutes of collection. The tissue samples were frozen in 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) and 90% foetal calf serum (FCS) or immediately minced into pieces approximately 0.5–1 mm³ and incubated in “standard medium” DMEM/F12 1:1 containing 1% Penstrep, 1% ITS and 0,1% Gentamycin with 200 U/ml Type II Collagenase for 4 hours at 37°C and vortexed every 20 min. The obtained cells were immediately sieved and seeded into experiment as primary culture, cultivated until 2nd passage and then seeded into the experiments, or both, the primary and 2nd passage cells, were frozen in 10% DMSO and 90% FCS.

The hormonal experiments were performed on the primary and 2nd passaged mixed antler cell cultures in the presence of 1% or 10% FCS. Cell proliferation was measured after 24h, 2x24h and 6x24h of the hormonal treatment. The following concentrations of treatments were used: testosterone (T) 1 nM, 10 nM; insulin like growth factor-1 (IGF-1) 6.5 nM and 13 nM; combinations of testosterone and IGF-1; 17 β -estradiol (E) 1 nM, 10 nM as well as Cyproterone acetate 100 nM, Flutamide 100 nM and antiestrogen ICI 182,780 100 nM in various combinations. The control (C) was always the same procedure, without any hormonal treatment. To determine the cell proliferation potential, 16 hours before the termination of incubation ³H thymidine (Methyl-³H thymidine, s. a. 6–7 Ci/mmol) was added in the final concentration of 1 mCi/ml into each well. The DNA synthesis was measured by incorporation of ³H thymidine using the

technique of TCA precipitation and liquid scintillation counting as described in Vacková et al. [16].

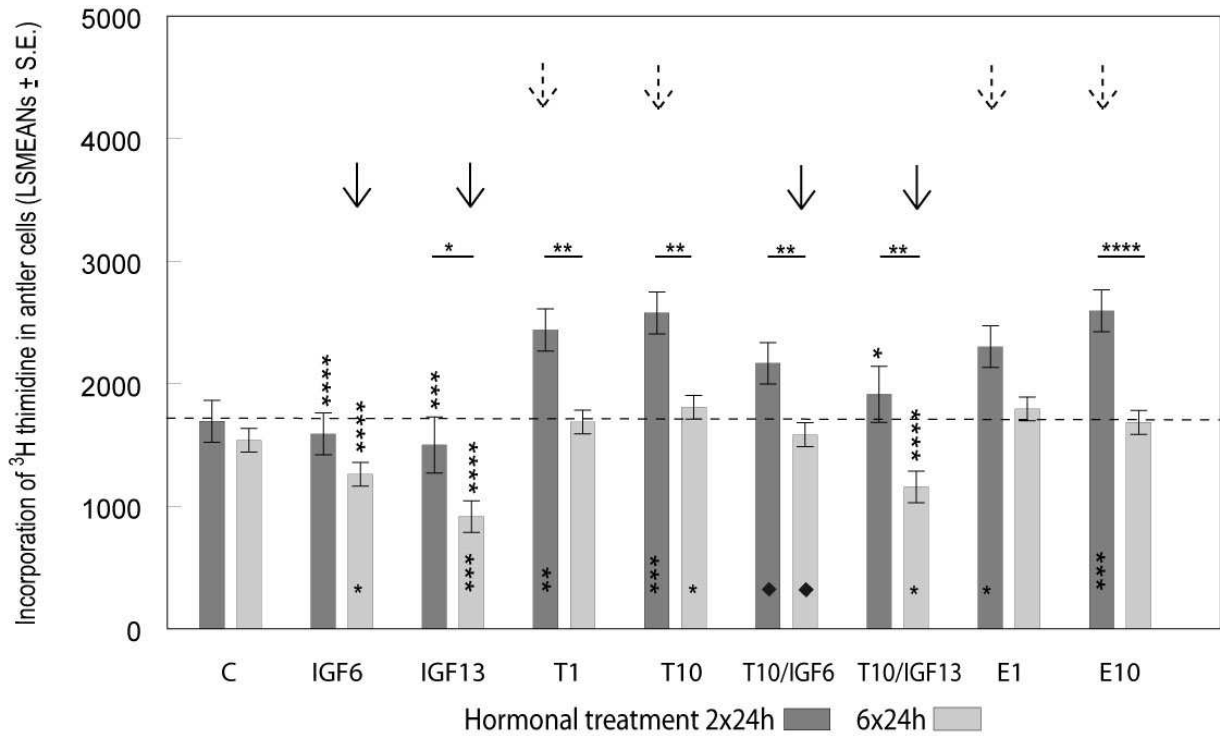
For the separation of the mesenchymal stem cells, frozen tissue and cells of red deer were used. For the purposes of statistical analyses of the factors affecting the numbers of mesenchymal stem cells in mixed antler cell cultures prior to separation we analyzed 58 MACS[®] separation procedures for red deer and 130 for fallow deer (*Dama dama*). Analyzed fallow deer cultures were obtained from four farmed fallow deer males at the age of two to six years and sampled between the 30th to 90th day after previous antlers had been cast. The fallow deer males were slaughtered and sampled 1-2 cm under the growing tip and additionally from the antler bone, antler periosteum and pedicle periosteum. Obtained tissue was minced into pieces approximately 0.5–1 mm³ and the cells were let grow out of cultured tissue pieces until confluence. Fallow deer cells were cultivated until the 7th passage in DMEM supplemented with 10% FCS under standardized laboratory conditions (37°C and 5% CO₂). Mesenchymal stem cells positive to STRO-1 antibody were isolated from all passages of red and fallow deer as follows. Mixed cell cultures were labelled with a primary antibody to surface antigen STRO-1, coupled with secondary antibody IgG-MicroBeads and separated with MACS[®] according to the manufacturer's protocols. The cells were counted before and after MACS[®] separation using a CASY cell counter. All MACS[®] separations were performed in the same laboratory as part of a greater long term study on antler stem cells. Analyzed factors were the sampling site (on antler or pedicle), cell passage (0-7) and type of cell culture (mixed or further cultivated STRO-1 negative culture).

For statistical analyses in all cases we used General Linear Mixed Model using the PROC MIXED procedure (SAS V9.0 and 9.1) with least-square-means (LSMEANS) and the Tukey-Kramer adjustment for multiple comparisons. The significance of each fixed effect in the GLMM model was assessed by the F-test and differences between classes were tested by t-test.

4 RESULTS AND DISCUSSION

In the presented study, first we concentrated on the factors and hormonal treatments which influence the proliferation of the mixed antler cell cultures *in vitro*. We found out that the proliferation intensity of cultivated antler cells *in vitro* depended on all investigated factors, namely, male individuality ($P < 0.0001$), passage ($P < 0.0001$) and, as was expected, on the concentration of FCS ($P < 0.0001$) [17] (Paper I). When comparing only passaged cell cultures from the 30th and 60th day of the tissue sampling after the previous set of hard antlers has been cast, we did not find any difference between the two sampling days [17] (Paper I). Contrary to passaged cell cultures, we found highly significant differences among 15th, 30th and 60th day of the tissue sampling in primary cultures, both in 1% and 10% FCS ($P < 0.0001$ for both) [34] (Paper III). Identically the proliferation intensity was significantly dependent on the length of the experiment ($P < 0.0001$) [34] (Paper III). Generally the higher percentage of FCS (10%) emphasized the inter-individual differences among the males apparent in the 1%

FCS while passage changed the proportion of the proliferative intensity among the individual males [17] (Paper I). On the other hand, passage, length of the experiment and tissue sampling day influenced significantly the proliferative response of the cultured cells to the hormonal treatments which varied depending on these factors. How the effect of sex steroids and IGF-1 varied depending on the length of the experiment is shown in the Figure 1.



Obř. 2: The effect of testosterone, IGF-1 and estradiol on the proliferation of passaged mixed antler cells cultures from 30th and 60th sampling day in 1% FCS after 2x24h and 6x24h of hormonal treatment. $\star \diamond P < 0.05$, $\star\star P < 0.01$, $\star\star\star P < 0.001$, $\star\star\star\star P < 0.0001$. Stars above the lines represent differences between 2x24h and 6x24h of hormonal treatment. Stars inside the columns represent difference from the control. Stars above the columns represent difference from 10nM T. Spades inside the column represent difference from 6nM IGF-1. Only relevant significances are depicted. $n = 15$ [34] (Paper III).

As described below, considerable amounts of mesenchymal stem cells (MSC) (up to 38,9% for fallow deer and 16,5% for red deer) can be isolated from mixed antler cell cultures, what allows us to some extent to compare some of the MSC culture characteristics to our mixed antler cell cultures. A great inter-individual variability in the proliferative response of ovine and rabbit mesenchymal stem cells [19, 20] was also described in several studies. Similarly, passage and percentage of FCS are of great importance and many studies demonstrate that these might change significantly the character and expression of cultured cells [21–24]. We conclude that independently of whether the experiments were performed in serum or serum free conditions, the precultivation of antler cells in 10% FCS may cause the cells to react differently, for example

to hormonal treatments. In our view the primary cultures without any passaging and long term FCS pretreatment may better represent the *in vivo* conditions and processes that occur in regenerating antlers [17] (Paper I).

Following our conclusions, we further performed hormonal experiments both on primary and the second passage antler cell cultures [34] (Paper III). The proliferation of the cells varied greatly and no hormone showed any general trend in the proliferative response of the antler cells. In the experiments with passaged cells testosterone, estradiol and IGF-1 showed a dual effect depending on the length of the experiment - hormonal treatment (Fig.2). While testosterone and estradiol significantly stimulated antler cell proliferation in both concentrations (1nM T: $P < 0.01$; 10nM T: $P < 0.001$; 1nM E: $P < 0.05$; 10nM E: $P < 0.001$; Fig. 2 dashed-line arrows) after short-time treatment 2x24h, IGF-1 had no significant effect. In contrast to this, after long-time treatment 6x24h, testosterone and estradiol had little or no effect (10nM Testosterone $P < 0.05$) but IGF-1 showed significant inhibition of the antler cells as compared to the control in both concentrations (6nM IGF: $P < 0.05$; 13nM IGF: $P < 0.001$; Fig. 2 solid-line arrows). IGF-1 also significantly inhibited the stimulating effect of testosterone (10nM T/13nM IGF: $P < 0.05$) (Fig.2).

In the experiments without precultivation, the effect of particular hormonal treatments varied significantly depending on the sampling day and was less notable than in the experiments with passaged cells. Testosterone significantly stimulated only proliferation of the cells from the 15th sampling day (1nM T: $P < 0.05$, 10nM T: $P < 0.01$). Estradiol showed inhibiting effect only on the cells from 30th day (10nM E: $P < 0.05$), while IGF-1 had no effect on the antler cell proliferation. Only on the 60th day did the higher concentration of IGF-1 (13nM) show a weak but not significant effect to cell proliferation. However, again co-treatment of testosterone with IGF-1 significantly inhibited mitogenic effect of testosterone (1nM T/6nM IGF: $P < 0.05$, 10nM T/6nM IGF: $P < 0.01$), but only by cell cultures from the 15th day after antler casting. Antisteroidal treatments did not show any consistent effect on the proliferation of the antler cells either alone or in the combinations with steroids and growth factor IGF-1.

As for the testosterone and estradiol, our results are in line with Price et al. [3], who stated that testosterone as well as estradiol will induce the proliferation of cells cultured from antlers, although the proliferative response appears to depend on the stage of antler growth and the stage of cell differentiation. The study of Rolf et al. [10] also confirmed the proliferative effect of testosterone on antler cells *in vitro*. On the other hand our experiments could not confirm the stimulating effect of IGF-1 on antler cell proliferation demonstrated by other authors [11–13]. Moreover IGF-1 in several cases inhibited the mitogenic effect of testosterone, which is also in contrast to Sadighi et al. [13] who concluded that testosterone did not sensitize antler cells to the mitogenic effect of IGF-1 *in vitro* and significantly decreased the mitogenic effect caused by IGF-1. Although markers of differentiation were examined neither in our, nor in their studies, testosterone might sensitize the cells not only to the mitogenic but also to the differentiating effects of IGF-1, as was previously reported for other bone tissues [25, 26]. In accordance with this, Elliott et al. [27] suggested that IGF-1 induces mainly differentiation in antlers. They

localized the receptors for IGF-1 to the chondroblast zone of the growing antler, which implies its involvement in the cartilage formation through matrixogenesis. According to Elliott, there is no support for IGF-1 having a major role in mitosis in the antlers. Indeed, in the study of Colitti et al. [28] on antlers, chondroprogenitors did not proliferate and proliferation was barely detectable in cartilage. On the other hand, the estrogen receptors [29] and probably also the androgen receptors [30] were found in the fibrous perichondrium, where proliferative cells are present [28].

This discrepancy among *in vitro* studies might, however, be caused by factors already mentioned above. All previous *in vitro* experiments on antler cells were performed after precultivation in 10% FCS and/or on cells derived on the 60th day after antler casting. Moreover experiments performed in partially serum-free conditions or in low concentrations of FCS might bring opposite results. Furthermore Patel et al. [22] demonstrated on cells derived from pulpal tissue that passaging and further cultivation pronounced differences with the primary cultures and represents cellular adaptation and/or selection for particular cell population with enhanced ability to thrive on tissue culture plastic. Another important factor to mention is that all hormonal experiments on antler cells so far, including ours, have been performed on mixed cell cultures. These cultures consist of progenitor cells and cells in different stages of their chondroblastic or osteoblastic differentiation. Such cultures may give different results depending on the ratio of particular cell types. Since both sex steroids and IGF-1 are known to have mitogenic effect or cause the differentiation of bone tissue cells depending on the cell stage [31–33], this explanation is the most probable.

If antler renewal is caused by re-activation of stem cells in the pedicle periosteum and the antler growth is localised to growing antler tip, where the progenitors proliferate, then the hormonal experiments performed on such cells would be of high significance in elucidating the question of “antler stimulating hormone”. Therefore, we concentrated in our next experiments on isolation of mesenchymal stem cells positive to superficial antigen STRO-1 antigen out of mixed antler cell cultures [18] (Paper II). STRO-1 positive cells are probably one of the most important stem cell populations which give rise to chondroprogenitors and osteoprogenitors [18] (Paper II). The percentage of obtained STRO-1 positive cells varied greatly from 0.4% to 38.9% for fallow deer and from 1.8% to 16.5% for red deer. Unfortunately, we were not able to isolate sufficient amounts of positive cells for extensive hormonal experiments or expand them without losing their undifferentiated potential. So we analyzed the factors affecting the number of obtained STRO-1 positive cells. The first factor was the type of cell culture, either mixed culture or further cultivated negative culture after the sorting. As was already described also by Stewart et al. [35], we were able to isolate STRO-1 positive cells even from multiple-times cultivated and sorted STRO-1 negative cultures. So the STRO-1 positive cells have to arise from the STRO-1 negative cultures. One of the explanations would be that there are even earlier precursor cells which after some time of cultivation mature and become STRO-1 positive. Another explanation is that our method was not sensitive enough to separate cells which possess only the smaller number of STRO-1 surface antigen and whose numbers increase

only later during further cultivation. The type of culture was a significant factor for both red ($P < 0.05$) and fallow deer ($P < 0.0001$), but the results differed. While the percentage of obtained STRO-1 positive cells from a mixed culture was significantly higher compared to the STRO-1 negative culture of fallow deer, it was the opposite for red deer cells. In addition to the type of the culture we analyzed the effect of sampling site and the effect of passage. We did not detect any significant influence of the cell sampling site of the antler or pedicle. It is hence probable that the cultivation procedure affected the yields of STRO-1 positive cells up to the level that overrides the anticipated effect of sampling site, particularly the pedicle periosteum, which is supposed to be the initiation tissue for antler re-growth [36]. However for both red and fallow deer cell cultures passage was a highly significant factor (red deer $P < 0.001$, fallow deer $P < 0.0001$). In general, the highest percentage of STRO-1 positive cells was obtained from the second passage, both in fallow deer ($24.6\% \pm 14.37$) and red deer ($5.5\% \pm 3.03$). As the positive cells differentiated rapidly after sorting, the increased yields of positive cells from the second passage could be explained by the presence of cells in various stages of expression of STRO-1 marker and their continuously changing multilineage potential and ongoing differentiation [35, 37, 38]. Simmons and Torok-Storb [39] found a comparable pattern of a significant increase in the proportion of STRO-1 positive cells after two weeks of cultivation, followed by a progressive decline. They concluded that it is a culture epiphenomenon unrelated to normal *in vivo* conditions, or it occurred due to the maturation of stromal precursors into more differentiated stromal cell types as discussed above. Our analysis revealed that we can maximize the number of STRO-1+ cells in the cultures by manipulating the cultivation factors.

Again we demonstrated that the cultivation factors might significantly affect the antler cell cultures and override the factors affecting the antler growth *in vivo*, which were in our case the effect of sampling site, sampling day or male individuality.

The last paper of the thesis [8] (Paper IV) is a review analyzing endocrine aspects of the relationships between antlerogenesis and rank-related behavior. In particular, we analyzed the arguments in favor and against the role of testosterone and IGF-1 in antler growth and presented a comparison of the results obtained across some deer species. We concluded that testosterone and not IGF-1 is the main antler stimulating and regulating hormone in *in vivo* studies.

5 CONCLUSIONS

Our experiments confirmed the significant effect of factors antler sampling day, male individuality, passaging, foetal calf serum concentration and length of the experiment (hormonal treatment) on the antler cell proliferation *in vitro*. The cultivation factors, mainly passage, also significantly influenced the number of stem cells obtained from the mixed antler cell cultures.

The proliferative response of antler cells to hormonal treatments varied significantly with respect to all the factors. We observed significant difference in the proliferative response of antler cells between two examined concentrations of foetal calf serum. In the high concentration, the responses were more intense and for some treatments even opposite to the ones in the low concentration. The same goes for primary versus passaged cultures. As for the sampling day, the cells sampled on the 15th day after antler casting proliferated the most intensively. In our experiments we did not observe any consistent effect of the treatments. Generally, testosterone stimulated or did not show any effect on the antler cell proliferation. In contrast, IGF-1 did not stimulate or even inhibited the antler cell proliferation. Antisteroidal treatments and estradiol showed no general trend. Unfortunately we could not perform hormonal experiments on the stem cells isolated from the mixed antler cell cultures, since we were unable to obtain sufficient amounts of positive cells or to expand their numbers while keeping the undifferentiated potential. Despite this fact, our findings suggest that sex steroids play an important role in stimulation of antler growth but their effect seems to be time- and antler-stage dependent. In addition, we could not confirm the mitogenic effect of IGF-1 reported by the previous *in vitro* studies [11–13]. Our results are in accordance with many physiological and behavioural *in vivo* studies and support the role of testosterone in the antler re-growth phase [8]. Furthermore, our results suggest that the primary cultures may better represent *in vivo* conditions and processes that occur in regenerating antlers.

In conclusion, we believe that testosterone might be the “antler growth stimulus”, but since there are many factors influencing antler cell proliferation *in vitro* and the antler regeneration/re-growth study is in its beginning, there is a need for further and more detailed experiments that could confirm this hypothesis.

REFERENCES

- [1] Price J.S., Allen S., Faucheux C., Althnaian T., Mount J.G. Deer antlers: a zoological curiosity or the key to understanding organ regeneration in mammals? *Journal of Anatomy* 207, 603-18 (2005).
- [2] Li C., Wang W., Manley T., Suttie J.M. No direct mitogenic effect of sex hormones on antlerogenic cells detected in vitro. *General and Comparative Endocrinology* 124, 75-81 (2001).
- [3] Price J., Faucheux C., Allen S. Deer antlers as a model of mammalian regeneration. *Current Topics in Developmental Biology* 67, 1-48 (2005).
- [4] Suttie J.M., Fennessy P.F., Lapwood K.R., Corson I.D. Role of steroids in antler growth of red deer stags. *The Journal of Experimental Zoology* 271, 120-30 (1995).
- [5] Gomendio M., Malo A.F., Roldan E.R.S. Testosterone and male fertility in red deer. *Science* 316, 980-981 (2007).
- [6] Bartoš L., Schams D., Bubenik G.A. Testosterone, but not IGF-1, LH, prolactin or cortisol, may serve as antler-stimulating hormone in red deer stags (*Cervus elaphus*). *Bone* 44, 691-8 (2009).
- [7] Bartoš L., Schams D., Kierdorf U., Fischer K., Bubenik G.A., Siler J., Losos S., Tománek M., Lastovková J. Cyproterone acetate reduced antler growth in surgically castrated fallow deer. *The Journal of Endocrinology* 164, 87-95 (2000).
- [8] Bartoš L., Bubenik G.A., Kužmová E. Endocrine relationships between rank-related behavior and antler growth in deer. *Frontiers in Bioscience, in press* (2011).
- [9] Price J., Allen S. Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359, 809 (2004).
- [10] Rolf H.J., Wiese K.G., Siggelkow H., Schliephake H., Bubenik G.A. In vitro-studies with antler bone cells: Structure forming capacity, osteocalcin production and influence of sex steroids. *Osteology* 15, 245-257 (2006).
- [11] Price J.S., Oyajobi B.O., Oreffo R.O.C., Russell R.G.G. Cells cultured from the growing tip of red deer antler express Alkaline Phosphatase and proliferate in response to insulin-like growth factor I. *Journal of Endocrinology* 143, R9-R16 (1994).
- [12] Sadighi M., Haines S.R., Skottner A., Harris A.J., Suttie M. Effects of insulin-like growth factor-I (IGF-1) and IGF-II on the growth of antler cells in vitro. *Journal of Endocrinology* 143, 461-469 (1994).

- [13] Sadighi M., Li C., Littlejohn R.P., Suttie J.M. Effects of testosterone either alone or with IGF-I on growth of cells derived from the proliferation zone of regenerating antlers in vitro. *Growth Hormone & IGF Research* 11, 240-6 (2001).
- [14] Rolf H.J., Kierdorf U., Kierdorf H., Schulz J., Seymour N., Schliephake H., Napp J., Niebert S., Wölfel H., Wiese K.G. Localization and characterization of STRO-1 cells in the deer pedicle and regenerating antler. *PLoS ONE* 3, e2064 (2008).
- [15] Matich J., Nicholson L.F.B., Barling P.M. Mitotic activity in the growing red deer antler. *Cell Biology International* 27, 625-632 (2003).
- [16] Vacková I., Engelová M., Marinov I., Tománek M. Cell cycle synchronization of porcine granulosa cells in G1 stage with mimosine. *Animal Reproduction Science* 77, 235-245 (2003).
- [17] Kužmová E., Bartoš L., Kotrba R., Bubenik G.A. Effect of different factors on proliferation of antler cells, cultured in vitro. *PLoS ONE* 6, e18053 (2011).
- [18] Kužmová E., Bartoš L., Kotrba R., Rolf H.J., Bubenik G.A. The effect of testosterone and IGF-1 on antler cell proliferation in vitro. *Submitted*.
- [19] Rhodes N.P., Srivastava J.K., Smith R.F., Longinotti C. Heterogeneity in proliferative potential of ovine mesenchymal stem cell colonies. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 15, 397-402 (2004).
- [20] Solchaga L.A., Johnstone B., Yoo J.U., Goldberg V.M., Caplan A.I. High variability in rabbit bone marrow-derived mesenchymal cell preparations CT. *Cell Transplantation* 8, 511-519 (1999).
- [21] Uchida K., Urabe K., Naruse K., Ujihira M., Mabuchi K., Itoman M. Comparison of the cytokine-induced migratory response between primary and subcultured populations of rat mesenchymal bone marrow cells. *Journal of Orthopaedic Science* 12, 484-92 (2007).
- [22] Patel M., Smith A.J., Sloan A.J., Smith G., Cooper P.R. Phenotype and behaviour of dental pulp cells during expansion culture. *Archives of Oral Biology* 54, 898-908 (2009).
- [23] Pochampally R.R., Smith J.R., Ylostalo J., Prockop D.J. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* 103, 1647-52 (2004).
- [24] Yokoyama M., Miwa H., Maeda S., Wakitani S., Takagi M. Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106, 46-50 (2008).
- [25] Gori F. Effects of Androgens on the Insulin-Like Growth Factor System in an Androgen-Responsive Human Osteoblastic Cell Line. *Endocrinology* 140, 5579-5586 (1999).

- [26] Itagane Y., Inada H., Fujita K., Isshiki G. Interactions between steroid hormones and insulin-like growth factor-I in rabbit chondrocytes. *Endocrinology* 128, 1419-24 (1991).
- [27] Elliott J.L., Oldham J.M., Ambler G.R., Bass J.J., Hodgkinson S.C., Breier B.H., Gluckman P.D., Spencer G.S.G., Suttie J.M. Presence of Insulin-Like Growth Factor-1 Receptors and Absence of Growth Hormone Receptors in the Antler Tip. *Endocrinology* 130, 2513 - 2520 (1992).
- [28] Colitti M., Allen S.P., Price J.S. Programmed cell death in the regenerating deer antler. *Journal of Anatomy* 207, 339-51 (2005).
- [29] Barrell G.K., Davies R., Bailey C.I. Immunocytochemical localization of oestrogen receptors in perichondrium of antlers in red deer (*Cervus elaphus*). *Reproduction, Fertility and Development* 11, 189-192 (1999).
- [30] Bubenik G.A., Brown G.M., Bubenik A.B., Grota L.J. Immunohistological localization of testosterone in the growing antler of the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Calcified Tissue Research* 14, 121-30 (1974).
- [31] Vandenput L., Swinnen J.V., Boonen S., Van Herck E., Erben R.G., Bouillon R., Vanderschueren D. Role of the androgen receptor in skeletal homeostasis: the androgen-resistant testicular feminized male mouse model. *Journal of Bone and Mineral Research* 19, 1462-70 (2004).
- [32] Venken K., Callewaert F., Boonen S., Vanderschueren D. Sex hormones, their receptors and bone health. *Osteoporosis International* 19, 1517-25 (2008).
- [33] Ciarmatori S., Kiepe D., Haarmann A., Huegel U., Tönshoff B. Signaling mechanisms leading to regulation of proliferation and differentiation of the mesenchymal chondrogenic cell line RCJ3.1C5.18 in response to IGF-I. *Journal of Molecular Endocrinology* 38, 493-508 (2007).
- [34] Kužmová E., Kotrba R., Rolf H.J., Bartoš L., Wiese K.G., Schulz J., Bubenik G.A. Factors affecting the number of STRO-1+ stem cells derived from regenerating antler and pedicle cells of red and fallow deer. *Animal Production Science* 51, S35-39 (2011).
- [35] Stewart K., Walsh S., Screen J., Jefferiss C.M., Chainey J., Jordan GR, Beresford JN. Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 14, 1345-1356 (1999).
- [36] Li C., Mackintosh C.G., Martin S.K., Clark D.E. Identification of key tissue type for antler regeneration through pedicle periosteum deletion. *Cell and Tissue Research* 328, 65-75 (2007).

- [37] Yu J., He H., Tang C., Zhang G., Li Y., Wang R., Shi J., Jin Y. Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biology* 11,32 (2010).
- [38] Barbero A., Ploegert S., Heberer M., Martin I. Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* 48, 1315-1325 (2003).
- [39] Simmons P.J., Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78, 55-62 (1991).

CURRICULUM VITAE

Name: Erika Kužmová
Email: kuzmovae@gmail.com

ACADEMIC BACKGROUND

Ph.D. Study	Charles University in Prague, Faculty of Science Department of Ecology	2005 – 2011
<i>Ph.D. Thesis:</i>	Hormonal aspects of antler growth regulation	
<i>Supervisor:</i>	Prof.Ing.Luděk.Bartoš,DrSc.	
MSc.Study	Comenius University in Bratislava Faculty of Natural Sciences Department of Animal Physiology and Ethology	2003 – 2005
<i>MSc. Thesis:</i>	Social behaviour of Przewalski's horse (<i>Equus przewalskii</i>) in ZOO Bratislava	
<i>Supervisor:</i>	Doc. RNDr. Lucia Kršková, PhD.	
Bc. Study	Comenius University in Bratislava Faculty of Natural Sciences Department of Animal Physiology and Ethology	2000 – 2003

SCIENTIFIC EXPERIENCE

Institute of animal science Praha-Uhřetěves Department of Biology of Reproduction	Oct. 2005 – Sep. 2006
University of Göttingen, University Medical Center Department of Maxillofacial Surgery Research Group Experimental Osteology	Oct. 2006 – July 2007
Institute of animal science Praha-Uhřetěves Department of Ethology	Sep. 2007 – Dec. 2009
First Faculty of Medicine, Charles University in Prague Department of Pathophysiology Center of Experimental Hematology	Jan. 2011 – now

SELECTED PUBLICATIONS

PAPERS

Kužmová, E.; Bartoš, L.; Kotrba, R.; Bubenik, G.A. (2011) Effect of different factors on proliferation of antler cells, cultured in vitro. PLoS ONE 6(3): e18053. doi:10.1371/journal.pone.0018053 (Paper I in the Ph.D Thesis).

Kužmová, E.; Kotrba, R.; Rolf, H. J.; Bartoš, L.; Wiese, K.G.; Schulz, J.; Bubenik, G. A. (2011) Factors affecting the number of STRO-1+ stem cells derived from regenerating antler and pedicle cells of red and fallow deer. Animal Production Science 51 (4) pp. S35-39. (Paper II in the Ph.D Thesis).

Bartoš, L.; Bubenik, G.A.; **Kužmová, E.** (2011) Endocrine relationships between rank - related behavior and antler growth in deer with a focus on *in vivo* studies. Frontiers in Bioscience. *In press*. (Paper IV in the Ph.D Thesis)

Kužmová, E.; Bartoš, L.; Kotrba, R.; Rolf, H. J.; Bubenik, G. A. The effect of testosterone and IGF-1 on antler cell proliferation in vitro. *Submitted to an international journal*. (Paper III in the Ph.D Thesis).

PRESENTATIONS AT CONFERENCES

Kužmová, E.; Bartoš, L.; Tománek, M.; Kotrba, R.; Bubenik, G.A. (2006) Interindividual variability of antler cells cultivated in vitro under various treatments. Advances in deer biology. Proceedings of the 6th International Deer Biology Congress (Eds.: Bartoš, L.; Dušek, A.; Kotrba, R.; Bartošová-Víchová, J.) Prague, Czech Republic. pp. 169-170. (poster presentation).

Kužmová, E.; Kotrba, R.; Rolf, H. J.; Bartoš, L.; Wiese, K.G.; Schulz, J.; Bubenik, G. A. (2010) Investigation of the STRO-1+ cells derived from regenerating antler and pedicle cells of red and fallow deer males. Advances and challenges in deer biology. 7th International Deer Biology Congress (Eds.: Flueck, W.; Smith, J.; Charrier, A.) Huilo - Huilo, Chile: Fundacion Senda Darwin y Centro de Estudios Avanzados en Ecologia y Biodiversidad; pp. 119-120 (poster presentation).

Kužmová, E.; Kotrba, R.; Bartoš, L.; Rolf, H. J.; Wiese, K. G.; Bubenik, G. A. (2010) IGF-1 does not stimulate and testosterone does not inhibit antler cell proliferation in various types of in vitro experiments. Advances and challenges in deer biology. 7th International

Deer Biology Congress (Eds.: Flueck, W.; Smith, J.; Charrier, A.) Huilo - Huilo, Chile: Fundacion Senda Darwin y Centro de Estudios Avanzados en Ecologia y Biodiversidad; 2010; pp. 117-118. (poster presentation).

Kotrba, R.; Bartoš, L.; Bahbouh, R.; Höschl, C.; Šimeček, P.; **Kužmová, E.**; Pluháček, J.; Dušek, A.; Bartošová, J. (2010) Sociomapping - new tool for analysis and visualization of social, spatial and hormonal links between members of a red deer group. Advances and challenges in deer biology. 7th International Deer Biology Congress (Eds.: Flueck, W.; Smith, J.; Charrier, A.) Huilo - Huilo, Chile: Fundacion Senda Darwin y Centro de Estudios Avanzados en Ecologia y Biodiversidad; pp. 133-134.

