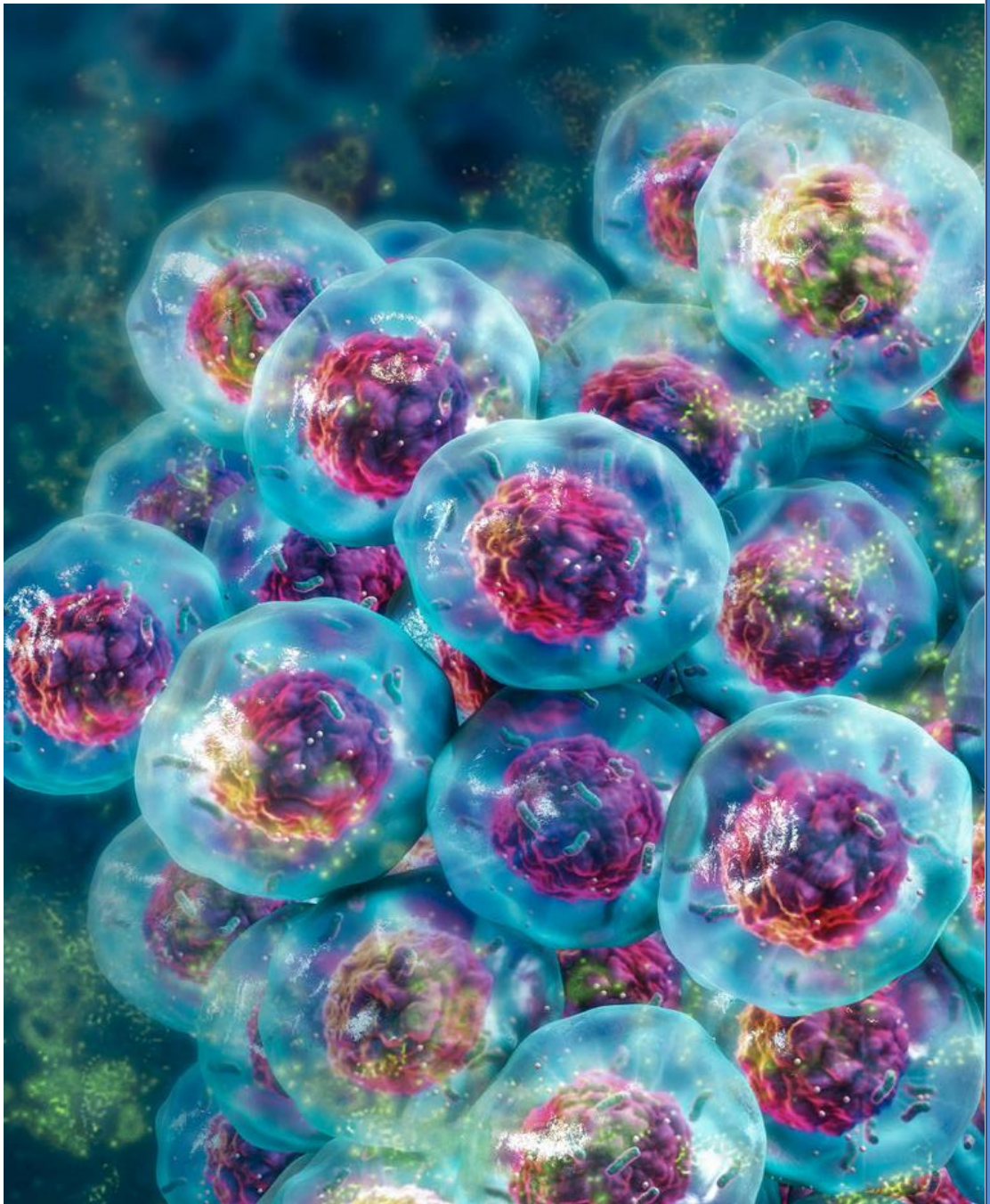


# TERAPEVTSKA BIOTEHNOLOGIJA

*Učbenik za vaje*



Elvira Maličev  
Mojca Jež

CIP - Kataložni zapis o publikaciji  
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

606:616-085(075.8)(076.5)

MALIČEV, Elvira

Terapevtska biotehnologija [Elektronski vir] : učbenik za vaje / Elvira Maličev, Mojca Jež ;  
[risbe Eva Kocjan]. - Dopolnjena izd. - Ljubljana : Zavod Republike Slovenije za  
transfuzijsko medicino, 2019

Način dostopa (URL): <http://www.ztm.si/knjiznica/studijska-literatura/>

ISBN 978-961-6596-19-0 (pdf)

1. Jež, Mojca, 1985-

COBISS.SI-ID 302831360

Recenzentki:

prof. dr. Vladka Čurin Šerbec, univ. dipl. kem.

prof. dr. Kristina Sepčić, univ. dipl. biol.

## KAZALO

<b>1</b>	<b>Napredna zdravljenja</b> .....	6
<b>2</b>	<b>Matične celice</b> .....	6
2.1	Krvotvorne matične celice.....	9
2.2	Mezenhimske matične celice.....	13
2.3	Pluripotentne matične celice .....	14
3.1.1	Postopki za dokazovanje pluripotentnosti .....	17
<b>3</b>	<b>Diferenciacija matičnih celic in vitro</b> .....	18
3.1	Diferenciacija krvotvornih in mezenhimskih matičnih celic .....	19
3.2	Diferenciacija pluripotentnih matičnih celic .....	20
<b>4</b>	<b>Tkivno inženirstvo</b> .....	21
4.1	PRIMER tkivnega inženirstva: Kako sestaviti srce v laboratoriju.....	22
<b>5</b>	<b>Laboratorij za celično biologijo</b> .....	25
5.1	Osnovna oprema.....	25
<b>6</b>	<b>Celične kulture</b> .....	26
6.1	Priprava celične kulture.....	26
6.2	Presajanje celic .....	28
<b>7</b>	<b>Medij in rastni pogoji</b> .....	29
7.1	Fiziološki parametri.....	29
7.2	Sestava medija.....	29
7.3	Opazovanje rasti celične kulture ter živosti celic .....	30
<b>8</b>	<b>Vaja 1 in 2: Postopki ločevanja in fenotipizacije celic</b> .....	31
1.	Postopki ločevanja celic .....	31
2.	Postopki fenotipizacije celic.....	35
<b>9</b>	<b>Vaja 3: Postopki določanja števila in živosti celic</b> .....	43
1.	Nekroza .....	43
2.	Apoptoza .....	43
<b>10</b>	<b>Vaja 4: Izolacija matičnih celic iz maščobnega tkiva</b> .....	53
<b>11</b>	<b>Vaja 5: Diferenciacija matičnih celic iz maščobnega tkiva</b> .....	58
1.	Odmrzovanje celic.....	58
2.	Diferenciacija ASC v adipocite.....	59
<b>12</b>	<b>Vaja 6: Izolacija in presaditev celic kostnega mozga pri miših kot model za razvoj genske terapije pri ljudeh</b> .....	65
1.	Protokol trenja kosti za pridobitev celic kostnega mozga pri miših.....	68
2.	Izolacija splenocitov .....	70
3.	Določanje himerizma po presaditvi kostnega mozga.....	71
<b>13</b>	<b>Vaja 7: Funkcijski celični testi in vitro</b> .....	73
1.	Izolacija mononuklearnih celic iz periferne krvi ali iz frakcije krvi bogate z levkociti.....	76
2.	Nasaditev MNC.....	77
3.	Opsonizacija eritrocitov .....	77
4.	Eritrofagocitoza in barvanje .....	78

14	<b>Vaja 8: Priprava trombocitnega gela</b> .....	80
15	<b>Literatura</b> .....	85

## KAZALO SLIK

Slika 1.....	7
Slika 2: Razvoj krvnih celic iz krvotvorne matične celice.....	10
Slika 3: Nekateri površinski celični označevalci humane krvotvorne matične celice. ....	11
Slika 4: Deleži različnih celic v krvi in kostnem mozgu.....	11
Slika 5.....	13
Slika 6.....	19
Slika 7.....	20
Slika 8: Različne oblike nosilcev. ....	22
Slika 9: V laboratoriju vzgojeno srce.....	24
Slika 10: Primer brezprašne komore in njenega delovanja .....	25
Slika 11: Suspenzijska in adherentna celična kultura.....	27
Slika 12: Rastna krivulja .....	28
Slika 13: Filtri različnih velikosti por v obliki nastavkov za centrifugirke.....	31
Slika 14: Osnovni deli celičnega ločevalnika.....	32
Slika 15: Ločevanje matičnih celic od ostalih celic v suspenziji s celičnim ločevalnikom (celičnim sorterjem). ....	33
Slika 16: Neposredna in posredne vezave magnetnih delcev (MicroBead) na celice.....	34
Slika 17.....	36
Slika 18: Izolacija MNC z gradientnim centrifugiranjem .....	37
Slika 19: Shematski prikaz ločevanja matičnih celic z uporabo kolon v magnetnem polju. ...	39
Slika 20: Razporeditev krvnih celic glede na njihovo velikost (FSC) in zrnatost (SSC).....	41
Slika 21: Prikaz rezultatov meritve s pretočnim citometrom na histogramu ali na točkovnem diagramu .....	42
Slika 22: Nekroza in apoptoza.....	44
Slika 23: Označevanje DNA fragmentov z BrdU ali z EdU .....	45
Slika 24: Mreža hemocitometra za štetje celic.....	46
Slika 25: Primer analize populacije CD34 + celic na pretočnem citometru .....	48
Slika 26: Barvili propidijev jodid in 7-AAD.....	49
Slika 27: Določanje apoptotičnih celic z barvilom Aneksin V. ....	50
Slika 28: Vzorec celic s sproženo apoptozo in kontrolne celice. ....	50
Slika 29: Vzorec po zadnjem centrifugiranju.....	56
Slika 30: Matične celice iz maščobe, pasaža 3.....	57
Slika 31: Matične celice v kulturi lahko diferenciramo v adipocite.....	61
Slika 32.....	63
Slika 33: Dolgotrajna kultura celic kostnega mozga gojena v laboratoriju .....	66
Slika 34.....	67

---

Slika 35: Presaditev kostnega mozga pri miši z injeciranjem donorjevih celic v repno veno.	70
Slika 36: Izolacija splenocitov .....	71
Slika 37: Monocyte monolayer assay .....	76
Slika 38: Trombociti v mirovanju (A) in aktivirani trombociti, ki sproščajo razne rastne dejavnike (B). .....	80
Slika 39: Izhodiščni vzorec (»buffy coat«) pred centrifugiranjem (levo). »Buffy coat« po centrifugiranju (desno). .....	82

Ilustracije: Eva Kocjan, mag. struk. funk. biol.

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Lastnosti različnih matičnih celic.....	8
Preglednica 2: Nekateri označevalci mezenhimskih matičnih celic. ....	14
Preglednica 3: Pluripotentni označevalci celične pripadnosti in njihova vloga. ....	15
Preglednica 4: Metode za določanje pluripotentnosti celic.....	17
Preglednica 5: Označevalci CD na celicah, ki jih zaznava <i>Human Lineage Cell Depletion Kit</i> .....	39

## 1 Napredna zdravljenja

Zdravljenje, ki vključuje celice, tkivno inženirstvo ali manipulacije z genskim materialom, imenujemo **napredno zdravljenje**. Pri **zdravljenju s celicami** uporabimo že linijsko usmerjene celice, zrele celice ali matične celice, ki pripomorejo k razvoju oziroma delovanju različnih vrst celic, posledica česar je nadomestilo manjkajočega ali nefunkcionalnega tkiva. Matične celice so najpogosteje uporabljene celice za zdravljenje. **Tkivno inženirstvo** je kombinacija uporabe celic, naravnih ali umetnih nosilnih materialov za te celice, biokemičnih dejavnikov ter inženirskih metod, z namenom priprave 3-D konstruktov, ki so ali bodo čim bolj podobni tkivom. Vendar se novejša raziskave usmerjajo tudi v pripravo 3-D konstruktov brez nosilnih materialov kot tudi 3-D konstruktov brez celic. Pojem **regenerativna medicina** se mnogokrat uporablja kot sinonim tkivnega inženirstva, a je pri regenerativni medicini več poudarka na uporabi matičnih celic. Namesto celic se namreč za zdravljenje lahko uporabijo tudi samo deli celic oziroma njihovi produkti. **Genska terapija** je vnos genskega materiala (transgena) v specifične celice z namenom, da bi z njim popravili obstoječo napako ali pridobili novo funkcijo in tako dosegli terapevtski učinek.

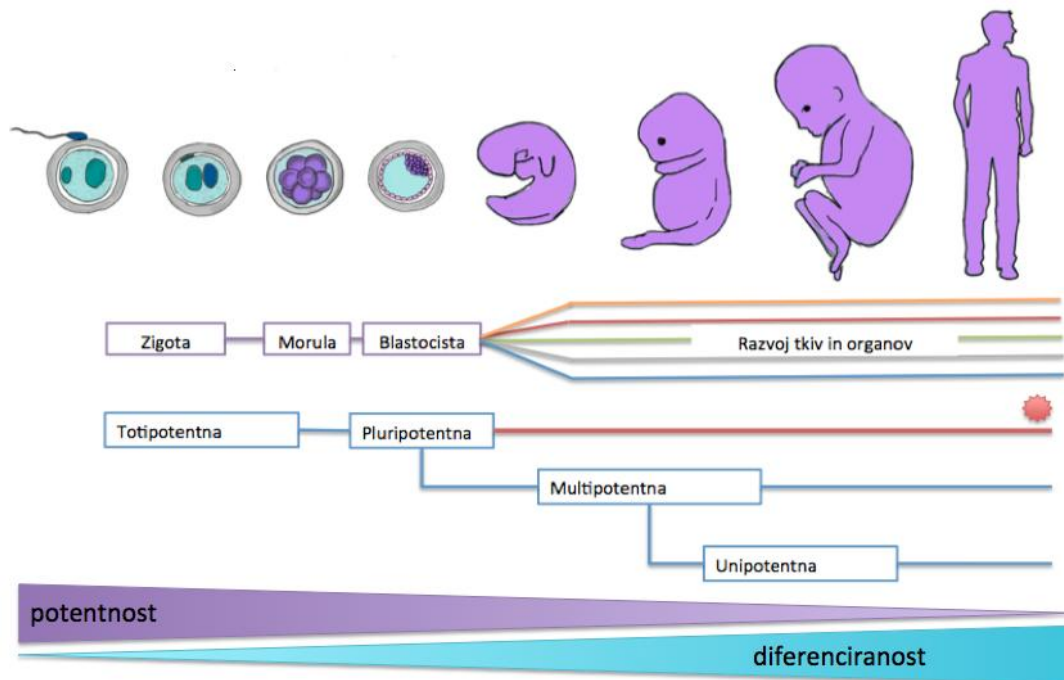
Glede na vir celic oziroma glede na odnos dajalec / prejemnik ločimo **avtologne** (uporaba bolnikovih lastnih celic) ter **alogenske** (uporaba celic drugega dajalca) presaditve.

Pri vseh treh oblikah naprednega zdravljenja se najpogosteje poslužujemo različnih matičnih celic. Matične celice lahko v laboratoriju z uporabo različnih snovi razvijemo v različne vrste specializiranih celic. Teoretično lahko s kombinacijo različnih vrst celic in uporabo tridimenzionalnih nosilcev oblikujemo tkiva in organe po želji ter z njimi nadomestimo poškodovane dele telesa pri bolnikih. V praksi pa se znanstveniki srečujejo z mnogimi izzivi. V laboratoriju so že uspešno vzgojili in presadili preproste votle organe (sapnik in mehur). Pripravili so tudi organčke podobne jetrom, možganom, srcu, vendar nas do priprave funkcionalnih organov čaka še dolga pot. Priprava organov namreč pomeni, da se mora na pravih mestih znajti več deset različnih vrst celic, med njimi pa se mora vzpostaviti tudi mreža krvnih žil, ki celice preskrbujejo s kisikom in hranili.

## 2 Matične celice

Matične celice so maloštevilčna populacija nespecializiranih celic, ki jih najdemo v tkivu zarodka in odraslega organizma. So nediferencirane, po obliki podobne limfocitom. Sposobne so dolgotrajnega asimetričnega deljenja, pri čemer na eni strani v procesu samoobnavljanja tvorijo sebi identične kopije, na drugi strani pa nove linije bolj diferenciranih celic. Med podvojevanjem in dozorevanjem se spreminja tako njihova oblika in velikost kot tudi izraženost različnih glikoproteinov na njihovi površini in v notranjosti. Z identifikacijo teh antigenov oziroma celičnih označevalcev ugotavljamo prisotnost oziroma številčnost matičnih celic v vzorcu ter njihovo usmerjenost in stopnjo razvoja.

Glede na potentnost razdelimo matične celice na totipotentne, pluripotentne, multipotentne in unipotentne. Manj kot so diferencirane, večja je njihova potentnost (slika 1).



**Slika 1: V različnih razvojnih stopnjah v razvoju osebkca se nahajajo matične celice z različnim razvojnim potencialom (potentnost).** Po trenutno prevladujoči teoriji se s staranjem osebkca zmanjšuje potentnost matičnih celic. Novejša dognanja so namigovala, da se tudi v odraslem človeku nahajajo matične celice z razširjenim razvojnim potencialom (rdeča črta, označena z zvezdico).

Matične celice odraslega organizma predstavljajo obetavno orodje v regenerativni medicini. Preden bodo na voljo za široko uporabo v kliniki, je potrebno določiti kateri vir celic ter katere celične lastnosti imajo najboljši učinek za določeno zdravljenje.

Glede na njihov izvor lahko matične celice razdelimo na embrionalne, fetalne in matične celice odraslega. Embrionalne matične celice so v zgodnjih fazah razvoja zarodka (gradijo notranjo celično maso blastociste) in imajo širok razvojni potencial, saj se lahko diferencirajo v več kot 200 različnih vrst celic, ki gradijo človeško telo. Fetalne matične celice najdemo v zarodku in v popkovnični krvi. Odrasle matične celice pa se nahajajo v vseh tkivih odraslega človeka in so v svojem razvoju bolj omejene. Največ jih je v kostnem mozgu in maščobi, prisotne pa so v večini tkiv.

**Preglednica 1: Lastnosti različnih matičnih celic.**

<b>Matične celice</b>	<b>Lastnosti</b>	<b>Lokacija v tkivu</b>
<b>Totipotentne matične celice</b>	Totipotentna je celica, ki je sposobna tvoriti celoten organizem, vključno z ekstraembrionalnim tkivom (trofoblast). Po nastanku blastociste pride do prve diferenciacije celic in do izgube totipotentnosti.	Zigota in zgodnje blastomere dokler zarodek ne doseže stopnje blastociste.
<b>Pluripotentne matične celice</b>	Pluripotentna matična celica je celica, ki je sposobna tvoriti vse telesne celice, vključno s spolnimi celicami. Znanstveni dokaz, da so neke celice pluripotentne, je njihova sposobnost diferenciacije v celice vseh treh kličnih listov (endoderm, ektoderm in mezoderm). Označevalci pluripotentnosti so molekule TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA4, alkalna fosfataza, TERT ter transkripcijski dejavniki OCT4 (POU5F1), NANOG, SOX2 in REX1. Pluripotentnost humanih embrionalnih matičnih celic vzdržuje kompleksen sistem celičnih mehanizmov, sestavljen iz zunanjih (ekstrinzičnih) signalov, sistema receptorjev in specifičnih signalnih poti (Wnt, ECM, BMP, FGF, TGF, Nodal in LIF) ter skladnega sistema jedrnih transkripcijskih dejavnikov. Obenem je v njih močna aktivnost telomeraz, encimov, ki podaljšujejo telomere kromosomov in s tem ohranjajo pluripotentnost tudi po delitvi celic.	Embriionalne matične celice izolirane iz notranje celične mase.
<b>Multipotentne matične celice</b>	Multipotentna matična celica je celica z manjšo potentnostjo in sposobnostjo diferenciacije v primerjavi s pluripotentno in totipotentno matično celico. Multipotentna celica lahko tvori različne tipe celic, ki pa vsi pripadajo istemu kličnemu listu.	Tkivno specifične matične celice, na primer hematopoetske (krvotvorne) in mezenhimske matične celice.
<b>Unipotentne matične celice</b>	Unipotentne matične celice so tkivno specifične in se lahko razvijejo v samo eno celično linijo. Imajo pa sposobnost samoobnavljanja in le-ta jih loči od somatskih celic.	Progenitorske (predniške) celice v koži in mišicah.

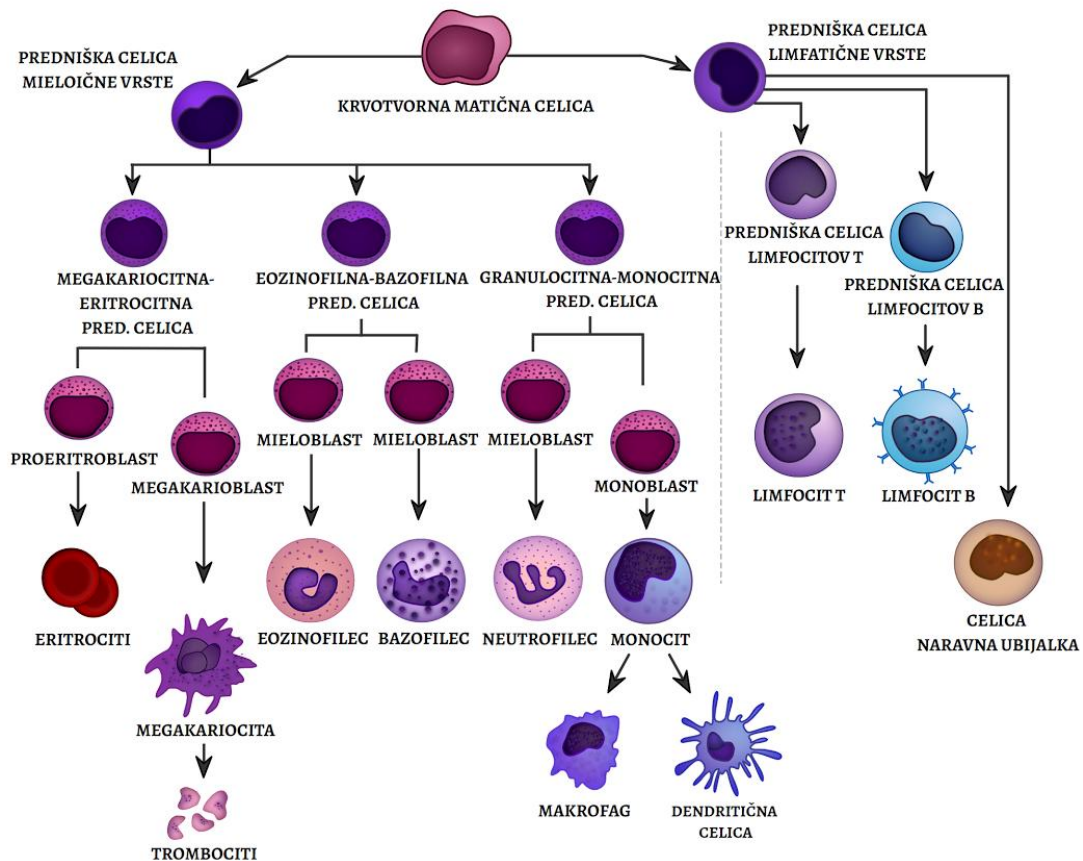
Za razvoj znanosti na področju matičnih celic so zelo pomembne raziskave in izkušnje s področja hematologije in presaditev kostnega mozga. Po uporabi atomskih bomb v drugi svetovni vojni se je začelo obširno raziskovanje vplivov sevanja na človeka. Med drugim sevanje uniči tudi celice v kostnem mozgu, kar lahko vodi do smrti. Najpogosteje je vzrok smrti izkrvavitev, ker sevanje uniči trombocitne, eritrocitne in levkocitne predniške celice in se zato krvotvorni sistem ne more obnavljati. Logična ideja za zdravljenje je bila presaditev kostnega mozga. Obstoj in delovanje krvotvornega sistema, kjer se iz matičnih celic razvijajo različne specializirane krvne celice, sta prva opisala James Till in Ernest McCulloch leta 1963, vendar je šele razvoj novejših postopkov omogočil izolacijo krvotvornih matičnih celic. Danes vemo, da se različne vrste matičnih celic nahajajo najverjetneje v vseh tkivih odraslega človeka.



Leta 1981 so Martin Evans, Matthew Kauffman in Gail Martin prvič uspešno izolirali notranjo celično maso iz mišjih zarodkov na stopnji blastociste, te celice so gojili v laboratoriju in jih poimenovali mišje embrionalne matične celice. Humane embrionalne matične celice so izolirali šele 17 let po odkritju mišjih. Leta 1998 jih je iz odvečnih zarodkov ostalih po zdravljenju neplodnosti izoliral James Tompson z Univerze v Wisconsinu. Do izolacije humanih embrionalnih matičnih celic je preteklo toliko časa zato, ker so zanje potrebni drugačni pogoji gojenja, omejen je dostop do zgodnjih humanih zarodkov, pojavljajo pa se tudi etični zadržki za njihovo uporabo.

## 2.1 Krvotvorne matične celice

Najstarejša in najbolj razširjena celična terapija je presaditev krvotvornih matičnih in predniških celic (KMC). Prvo presaditev sorodniških KMC za zdravljenje levkemije je opravil dr. E. Donnall Thomas leta 1957 in za razvoj tega načina zdravljenja prejel tudi Nobelovo nagrado leta 1990. Danes z rutinsko presaditvijo KMC zdravijo več kot 70 malignih in nemalignih bolezni. Uspešnost zdravljenja je pri bolnikih z nekaterimi boleznimi dosegla več kot 90-odstotkov. Letno opravijo na svetu več kot 50.000 presaditev KMC. Presaditev KMC je trenutno še vedno glavna izbira in pogosto edina možnost za zdravljenje nekaterih hematoloških in onkoloških bolezni.



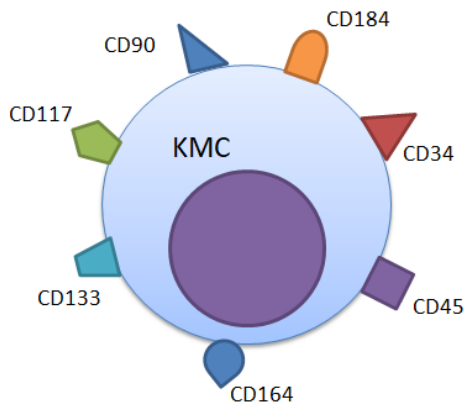
**Slika 2: Razvoj krvnih celic iz krvotvorne matične celice.**

Krvotvorna matična celice se lahko diferencira v mieločno in limfatično vrsto. S postopno diferenciacijo se preko različnih predniških celic razvijejo vse krvne celice.

Iz KMC se razvijejo vse celične vrste, ki so prisotne v krvi. S postopno diferenciacijo preko različnih stopenj predniških celic nastanejo vse celice limfatične vrste: limfociti T, limfociti B in celice naravne ubijalke, kot tudi celice mieločne vrste: monociti, makrofagi, nevtrofilci, bazofilci, eozinofilci, eritrociti in trombociti (slika 2).

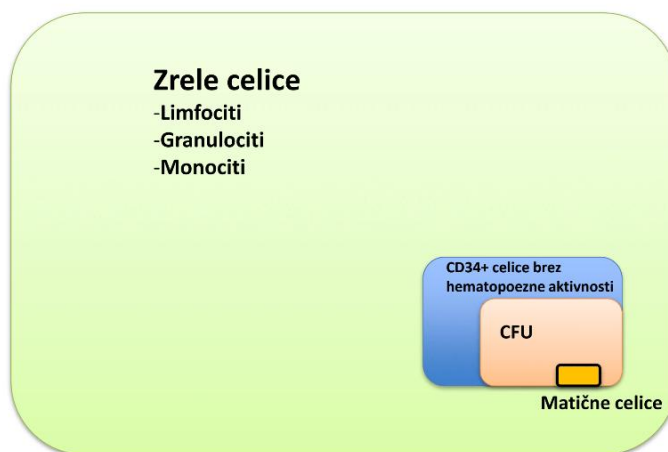
Nahajajo se v kostnem mozgu, od koder se izplavljajo v periferno kri, prav tako jih najdemo tudi v popkovnični krvi. V kostnem mozgu predstavljajo približno 1,5% populacije enojedrnih celic, v popkovnični krvi okoli 1%, v periferni krvi pa jih je manj kot 0,5%. Pri tretiranju odraslega bolnika z rastnimi dejavniki, kot je dejavnik, ki spodbuja razvoj granulocitov (G-CSF, ang. Granulocyte Colony-Stimulating Factor), lahko odstotek KMC v periferni krvi na račun mobilizacije celic iz kostnega mozga naraste od 1% do 5%.

Za humane krvotvorne matične celice so značilni celični označevalci: **CD34**, **CD45**, CD7, CD47, CD50, CD55, CD58, CD59, CD90, CD117, CD133, CD164 in CD184 (slika 3).



**Slika 3: Nekateri površinski celični označevalci humane krvotvorne matične celice.**

Obstaja več načinov za merjenje števila KMC v kostnem mozgu, periferni ali popkovnični krvi. Pri vsaki do metod se uporablja drugačne kombinacija označevalcev kar povzroča zmedo v literaturi. Pri človeku so označevalci KMC definirani precej bolje kot pri miših in trenutno velja, da sta najpomembnejša označevalca CD34 in CD45 s katerima zajamemo populacijo krvotvornih matičnih in predniških celic (slika 4). Le s funkcionalnimi testi *in vivo* pa lahko dobimo natančen podatek o številu matičnih celic (ang. Long Term Repopulating Stem Cells). Z ostalimi metodami običajno precenimo njihovo število.



**Slika 4: Deleži različnih celic v krvi in kostnem mozgu.** Le majhen del celic pozitivnih za CD34 celični označevalec predstavlja prave krvotvorne matične celice. Večji del predstavljajo različne predniške celice (CFU – ang. Colony Forming Unit).

Odkritje molekule CD34 je pri človeku omogočilo neposredno identifikacijo in štetje KMC. Antigen CD34 je transmembranski glikoprotein velikosti 104–120 kDa, ki pripada adhezijskim molekulam sialomucinom. Celice označene s protitelesi proti antigenu CD34 preštejemo s pretočnim citometrom, kar je trenutno edini način določanja koncentracije matičnih in predniških celic. Antigen CD34 je izražen na krvotvornih matičnih celicah vseh

celičnih linij ter na endotelijskih celicah žil in na stromalnih celicah v kostnem mozgu. Antigen CD45 se izraža na vseh krvnih prednicah razen na zrelih eritrocitih in njihovih prekursorjih. Po splošnem prepričanju sta za določitev števila krvotvornih matičnih in predniških celic ključna antigena CD45 in CD34. Najbolj zanesljiv postopek določanja števila krvotvornih matičnih celic je analiza s pretočnim citometrom po enostopenjskem ISHAGE protokolu (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering).

Terapija s KMC v obliki presaditev kostnega mozga ali krvnih celic, pridobljenih s citaferozo (ločevanje celic iz krvi na osnovi centrifugiranja, plazmo se vrne bolniku) iz stimulirane periferne krvi se že vrsto let uporablja za zdravljenje številnih levkemij ter različnih imunskih in genskih bolezni. Krvotvorne matične celice lahko pridobimo tudi iz popkovnične krvi in kostnega mozga. V primeru **alogenih** presaditev se pogosto pojavljajo težave pri iskanju tkivno skladnega darovalca. HLA (humani levkocitni antigen) je področje v genomu ljudi, ki kodira površinske antigene na celicah, ki sodelujejo pri imunskem odzivu. HLA je pomemben pri ločevanju lastnih molekul od tujih. Večinoma dopuščamo neskladje v enem HLA paru (9/10) in v dveh parih (8/10), če je vir presadka popkovnična kri, ki vsebuje imunološko še nedozorele, naivne limfatične celice. Če za pacienta ne najdemo ustreznega sorodnega ali nesorodnega darovalca, se lahko uporabijo KMC sorodnega neskladnega darovalca, ki pa ima skladen samo en haplotip HLA. V teh primerih je potrebno populacijo KMC dodatno očistiti in odstraniti limfocite T, ki bi povzročili zaplete pri presaditvi celic, največkrat v obliki akutne ali kronične bolezni presadka proti gostitelju (GVHD, ang. Graft Versus Host Disease). Bolezen presadka proti gostitelju je nezaželeno stanje, do katerega lahko pride po presaditvi alogenskega kostnega mozga ali kakšnega drugega organa oz. tkiva, pri katerem imunske celice darovalca napadejo celice prejemnika. **Avtologna** terapija s KMC se lahko uporablja za zdravljenje določenih levkemij ali avtoimunskih obolenj. S kemoterapijo najprej porušimo imunski sistem pacienta ter ga nato ponovno vzpostavimo s presaditvijo shranjenih lastnih KMC. Pri tem obstaja nevarnost, da presadimo tudi okvarjene celice in bolezen se ponovi. Za uspešnost takšnega pristopa je torej prav tako potrebno izolirati čisto populacijo KMC, brez rakavih celic ali avtoimunskih limfocitov T. V zadnjem času potekajo tudi raziskave zdravljenja srčnega popuščanja s KMC. Z vnosom dodatno očiščene populacije KMC neposredno na mesto poškodovanega tkiva so pri pacientih dosegli izboljšanje klinične slike. KMC naj bi izločale nekatere rastne dejavnike, ki spodbujajo regeneracijo miokarda in preprečujejo apoptozo.

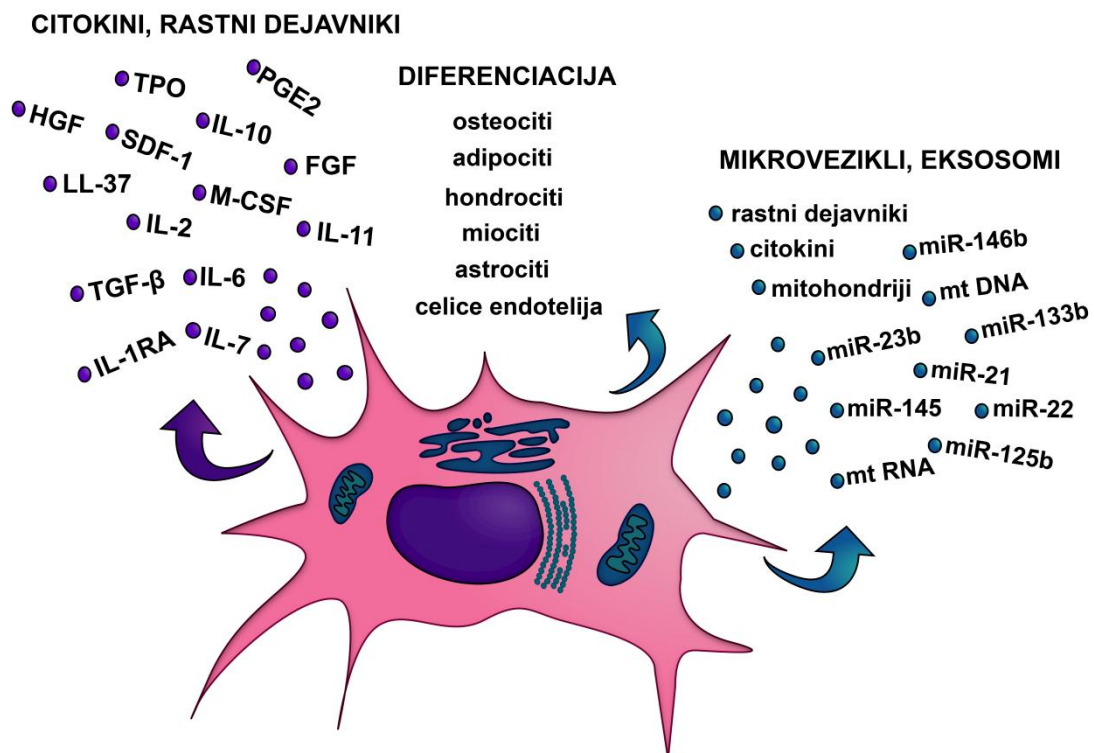
V periferni krvi je KMC relativno malo, z različnimi postopki lahko njihovo koncentracijo povečamo, pravimo, da populacijo KMC obogatimo. Izolacija obogatene populacije KMC navadno poteka s pozitivno imunomagnetno selekcijo na celični označevalec CD34. V primerih zdravljenja srčnega popuščanja je v uporabi tudi izolacija celic pozitivnih za CD133, ki naj bi bil izražen na najbolj primitivni populaciji KMC, hkrati pa ga najdemo tudi na endotelijskih predniških celicah, ki imajo pomembno vlogo pri vaskularizaciji tkiv. Za obogatitev KMC v klinične namene sta v uporabi avtomatizirana sistema, eden z večjimi polistirenskimi magnetnimi delci in drugi, ki temelji na majhnih biorazgradljivih magnetnih nanodelcih (glej dalje).

## 2.2 Mezenhimske matične celice

Mezenhimske matične celice so heterogene multipotentne celice, ki se nahajajo v različnih tkivih organizma. Pomembne so zaradi sposobnosti nadomeščanja celic, npr. v kosti, hrustancu, mišicah, vse bolj pa spoznavamo tudi njihove druge lastnosti, med njimi imunomodulatorne lastnosti, ki jih že izkoriščamo za zdravljenje. Številne druge lastnosti pa predstavljajo velik potencial za zdravljenje širokega spektra bolezni in poškodb (slika 5).

Mezenhimske matične celice izražajo več kot 30 različnih celičnih označevalcev (Preglednica 2), odvisno od vira in stopnje razvoja celic. Mednarodno združenje ISCT, »Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee«, je predlagalo tri minimalne kriterije, s pomočjo katerih lahko definiramo humane mezenhimske matične celice:

- mezenhimske matične celice morajo biti sposobne adherence na plastiko v standardnih pogojih gojenja v gojilnih posodah,
- več kot 95 % mezenhimskih matičnih celic v neki celični populaciji mora izražati celične označevalce CD73, CD90 in CD105, obenem pa sme manj kot 2 % celic te populacije izražati celične označevalce, specifične tudi za krvotvorne ali endotelijske celice (označevalci: CD45, CD34, CD14 ali CD11b, CD79 $\alpha$  ali CD19 in HLA-DR) in
- populacija mezenhimskih matičnih celic mora imeti sposobnost *in vitro* diferenciacije v kostne, maščobne in hrustančne celice.



Slika 5: Poleg diferenciacije v specifične celice lahko mezenhimske matične celice na različne načine delujejo na sosednje celice.

Mehanizem delovanja mezenhimskih matičnih celic pri regeneraciji tkiv je najverjetneje povezan z izločanjem citokinov, kemokinov in rastnih dejavnikov, ki izboljšujejo angiogenezo, zavirajo vnetje, inhibirajo apoptozo ter spodbudijo endogene popravilne mehanizme (slika 5).

Mezenhimske matične celice so izolirali iz kostnega mozga, mišičnega, maščobnega in vezivnega tkiva, amnijske tekočine, placente, popkovnične krvi in popkovnice (Whartonova žolica), jeter, krvi, pljuč, vranice in drugih tkiv. Poleg metode adherence na plastiko se za izolacijo ali koncentracijo mezenhimskih matičnih celic uporablja celični sorter. Za zdravljenje mišično-skeletnih bolezni se večinoma pripravljajo avtologne celice, nekaj novejših raziskav pa že proučuje možnost uporabe alogenskih celic.

**Preglednica 2: Nekateri označevalci mezenhimskih matičnih celic.**

POZITIVNI OZNAČEVALCI	NEGATIVNI OZNAČEVALCI
<b>Stro-1, CD10, CD13, CD58, CD71, CD73, CD90 (Thy-1), CD105, CD140b, CD146, CD133, vimentin</b>	CD4, CD8, CD11a, CD14, CD15, CD16, CD25, CD31, CD33, CD34, CD45, CD49b, CD49d, CD49f, CD50, CD62e, CD621, CD62P, CD80, CD86, CD106, CD117, CD235 (glikoforin A), kadherin V, HLA-DR
<b>Adhezijske molekule: CD29 (<math>\beta</math>-integrin), CD44 (HCAM), CD49e (<math>\alpha</math>5-integrin), CD54 (ICAM-1), CD106 (VCAM-1), CD166 (ALCAM)</b>	
<b>Odvisno od vira celic in pogojev gojenja <i>in vitro</i>: CD349 (frizzled-9), SSEA-4, Oct-4, nestin</b>	

## 2.3 Pluripotentne matične celice

Pluripotentne matične celice so po definiciji tiste celice, ki so sposobne diferenciacije v vse celice zarodka vključno s spolnimi celicami, ne morejo pa tvoriti izvenembrionalnih tkiv. Izražajo tipične površinske označevalce pluripotentnosti, kot so molekule SSEA-4, Tra-1-60 in Tra-1-81 in znotrajcelične transkripcijske dejavnike OCT4, SOX2, NANOG, c-kit, encima alkalno fosfatazo in telomerozo. Pluripotentne matične celice lahko ustvarimo tudi z reprogramiranjem somatskih celic (celice iPS, ang. induced Pluripotent Stem cells).

**Preglednica 3: Pluripotentni označevalci celične pripadnosti in njihova vloga.**

Površinski označevalec	Funkcija
<b>SSEA-4</b>	SSEA-4 je eden od označevalcev pluripotentnosti. SSEA-4 je glikoprotein, ki se izraža v zgodnjem embrionalnem razvoju in na pluripotentnih matičnih celicah. SSEA-4 je, podobno kot SSEA-3, označevalec humanih embrionalnih matičnih celic, humanih embrionalnih karcinomskih celic in humanih embrionalnih germinalnih celic. Monoklonska protitelesa proti temu antigenu se uporabljajo za karakterizacijo pluripotentnih matičnih celic. Mišje pluripotentne celice tega antigena ne izražajo, najdemo ga na njihovih diferenciranih celicah.
<b>Tra-1-60</b>  <b>Tra-1-81</b>	Keratan sulfatni antigen TRA-1-60 je označevalec pluripotentnih matičnih celic, predvsem humanih embrionalnih, germinalnih in karcinomskih celic, ne pa tudi mišjih. Poleg glikolipidnih antigenov SSEA-3 in SSEA-4 je TRA-1-60 značilen antigen na humanih embrionalnih matičnih celicah. Keratan sulfatni antigen TRA-1-81 je označevalec pluripotentnih matičnih celic. Najdemo ga na humanih embrionalnih, germinalnih in karcinomskih celicah, ne pa na mišjih celicah. Poleg glikolipidnih antigenov SSEA3 in SSEA4 je to značilen antigen za humane embrionalne matične celice.
<b>Transkripcijski dejavnik</b>	<b>Iz osrednje regulatorne mreže, ki vzdržuje pluripotentnost.</b>
<b>Oct-4</b>	Gen <i>OCT4</i> kodira istoimenski protein, ki je najzgodnejši izražen transkripcijski dejavnik in ključni urejevalec pluripotentnosti in embriogeneze pri sesalcih. Pripada družini transkripcijskih dejavnikov POU (sinonimi: POU5f1, Oct3, Oct3/4). Močno se izraža v totipotentnih in embrionalnih matičnih celicah pred gastrulacijo. Pri odraslih se izraža samo v oocitih in primordialnih spolnih celicah. Delovanje OCT4 je nujno za vzdrževanje pluripotentnosti celic. Embrionalna matična celica v odvisnosti od ravni izražanja OCT4 vzdržuje svojo pluripotentnost ali pa se diferencira. Z diferenciacijo celic izraženost OCT4 izgine.
<b>Sox-2</b>	<i>Sox2</i> je gen brez intronov, ki kodira transkripcijski dejavnik SOX2 (sinonim: SRY-box 2, sex determining region-box 2), ki je ključen za samoobnavljanje in ohranjanje nediferenciranega stanja embrionalnih matičnih celic. Zato se tudi pogosto uporablja kot specifični označevalec embrionalnih matičnih celic. Spada v družino genov <i>SOX</i> , ki skupaj z geni <i>HOX</i> in <i>PAX</i> sodijo med razvojne gene. Prvi odkriti dejavnik iz te družine je bil SRY (1990), danes pa je pri človeku poznanih več kot 20 proteinov iz te družine. Proteini SOX se vežejo na DNA in omogočijo ali onemogočijo prepisovanje v sodelovanju z drugimi proteini. Vsa tkiva v določenem razvojnem stadiju izražajo vsaj enega od transkripcijskih dejavnikov SOX.
<b>Nanog</b>	Gen <i>NANOG</i> kodira transkripcijski dejavnik NANOG, ki se izraža v embrionalnih matičnih celicah in je pomemben urejevalec v zgodnjem razvoju sesalcev in ključni dejavnik pluripotentnosti. Beljakovina NANOG ima 305 aminokislin z ohranjeno homeodomeno, ki se lahko veže na promotorske dele DNA. Vzdržuje matičnost celice, izražanje genov pa lahko ureja pozitivno ali negativno. NANOG se veže na promotorje več stotih genov in preko še vedno neznanih mehanizmov ureja njihovo izražanje. Predvsem deluje v sodelovanju s transkripcijskima dejavnikoma OCT4 in SOX2. Če aktivnost gena <i>NANOG</i> izgine, se začno celice naglo diferencirati v tri klične liste.

<b>c-kit</b>	c-kit (CD117) je gen oz. transmembranski protein - tirozin-kinazni receptor za citokine na krvotvornih matičnih celicah, na predniških celicah in tudi na celicah nekaterih nekrvotvornih tkiv. Ta receptor veže kot svoj ligand molekulo rastnega dejavnika SCF (stem cell factor). Med zorenjem celic se njegova izraženost večinoma zmanjša. Sproža več signalnih poti, ki so pomembne za urejanje proliferacije, preživetje in aktivacijo drugih funkcij KMC. Ima tudi onkogeni potencial, saj stalna izraženost receptorja c-kit lahko povzroči nastanek tumorjev.
--------------	---

Za zdravljenje so zanimive tako **matične celice iz zarodkov** kot tudi tiste, ki se nahajajo v tkivih odraslih ljudi. Največja prednost embrionalnih matičnih celic je njihova sposobnost, da se lahko razvijejo v vse različne vrste celic v človeškem telesu. V laboratoriju jih lahko tudi vzgojimo v velikem številu, ki je običajno potrebno za zdravljenje. Vendar imajo tudi nekaj ključnih slabosti, ki omejujejo njihovo klinično uporabo. Ker jih pridobimo iz zgodnjih zarodkov, so torej pacientu tuje (alogeneske), ter jih pacientovo telo po transplantaciji lahko zavrne (enak princip kot velja za npr. presaditev kostnega mozga). Pluripotentne matične celice so po svojih lastnostih (nediferenciranost, nesmrtnost, hitro razmnoževanje, izražanje določenih genov) zelo podobne rakavim celicam in lahko tvorijo tumorje, to pa je tudi lastnost, ki se je pri uporabi v kliniki najbolj bojimo. Alternativen način za pridobivanje pluripotentnih celic je reprogramiranje pacientovih lastnih odraslih celic v **inducirane pluripotentne matične celice**. Inducirane pluripotentne matične celice so pluripotentne celice, ki jih umetno dediferenciramo iz odraslih somatskih celic. Prve celice iPS so pridobili s transfekcijo fibroblastov z zgodnjimi embrionalnimi geni, ki se sicer značilno močno izražajo v pluripotentnih EMC (geni OCT4, SOX2, c-Myc in nekateri drugi). Za prenos genov v odraslo celico se lahko uporabijo retrovirusi ali drugi načini vnosa, na primer plazmidni vektorji. Celice iPS z izražanjem teh embrionalnih genov pridobijo lastnosti pluripotentnih celic. Na ta način rešimo problem tujega tkiva in preprečimo možnost zavrnitve, še vedno pa so te celice pluripotentne, ter lahko po presaditvi tvorijo tumorje.

Na splošno bo na področju nepredvidljivega obnašanje celic po presaditvi potrebno še veliko narediti. Težko se je namreč zanašati na reakcije celic, ki jih opazuješ v laboratoriju in predvidevati, kakšni bodo celični odgovori po presaditvi celic v telo. Posebno s pluripotentnimi matičnimi celicami se borimo na dveh nasprotujočih si frontah: na eni strani želimo, da bi se razvile v celično vrsto, ki jo potrebujemo, na drugi strani pa se borimo proti sposobnosti matičnih celic, da se spremenijo v rakave celice. Torej je za komercializacijo celičnih terapij nujno potrebna kontrola celičnega odgovora po presaditvi.

Dodatno to področje otežujejo še različni etični zadržki, ki se nanašajo na dejstvo, da je za izolacijo embrionalnih matičnih celic potrebno uničenje zarodka.

V zadnjih letih je več podjetji pridobilo dovoljenje za izvajanje kliničnih študij s celicami, pridobljenimi iz embrionalnih in induciranih pluripotentnih matičnih celic. Gre za proučevanje uporabe celic za zdravljenje poškodb hrbtenjače in zdravljenje nekaterih oblik slepote ter nekaterih drugih okvar in bolezni.



### 3.1.1 Postopki za dokazovanje pluripotentnosti

Pluripotentnost določene celice lahko dokažemo na več načinov. Načeloma je potrebno za natančnejšo karakterizacijo vsake preiskovane celice izpeljati vsaj pet metod (preglednica 4). Šele rezultati različnih metod nam namreč dajo natančen vpogled v lastnosti preučevane celične populacije.

**Preglednica 4: Metode za določanje pluripotentnosti celic.**

Postopek	Tehnika	Opis
Morfologija	Svetlobna ali elektronska mikroskopija	Matične celice so majhne, okrogle in imajo veliko jedro in malo citoplazme. Podobne so majhnim levkocitom. Te metode so zelo nespecifične, vendar omogočajo hiter pregled kulture.
Označevalci na ravni transkripcije	Verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR)	<i>OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, REX1, STELLA</i> , idr. Te metode pokažejo na podobne značilnosti, kot jih imajo embrionalne matične celice, vendar so lahko nekateri označevalci izraženi tudi na celicah, ki niso pluripotentne. Prednost je, da so ti testi hitri in nudijo pregled celotne kulture.
Označevalci na ravni proteinov ter specifični encimi	Prenos Western, imunocitokemija, pretočna citometrija	<i>OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, REX1, STELLA</i> ter telomeraza in alkalna fosfataza
Diferenciacija <i>in vitro</i>	Usmerjena diferenciacija v celične tipe, ki pripadajo vsem trem kličnim listom (ekto-, endo-, mezoderm). Tvorba embrioidnih teles.	Prikazuje širok diferencijski potencial in sposobnost diferenciacije v specifične tipe celic. Vendar ti testi ne prikazujejo nujno razvojne pluripotentnosti, so dolgotrajni, za izvedbo je potrebno veliko število celic.
Diferenciacija <i>in vivo</i>	Tvorba teratomov, intrablastocistna injekcija	Intrablastocistna injekcija in dopolnitev tetraploidne blastociste sta najstrožja testa pluripotentnosti. Zaradi etičnih zadžkov nista izvedljiva na humanih celicah.

**Prvi oziroma osnovni način** je analiza morfologije, ki jo lahko naredimo z različnimi oblikami svetlobne mikroskopije, ter s snemanjem s časovno mikroskopijo (ang. time lapse). Po obliki so embrionalne matične celice podobne drugim celicam *in vitro*, zato jih ne moremo določiti le na osnovi morfologije. **Drugi način** je določitev izražanja genov pluripotentnosti (transkripcijskih dejavnikov) na nivoju prepisovanja teh genov v mRNA, ki jo napravimo s pomočjo molekularno bioloških preiskav, predvsem z metodo RT-PCR ali z metodo RNA mikromrež. **Tretji način** je določitev značilnih molekul, ki se po prevajanju v proteine izrazijo na površini ali v notranjosti celice, ki jo naredimo z metodami, kot so imunocitokemično barvanje, prenos western (ang. Western blot), pretočna citometrija in druge. **Četrty način** je funkcionalni dokaz pluripotentnosti *in vitro*, ki ga običajno izvedemo z usmerjeno diferenciacijo preiskovanih matičnih celic v kulturi, v celične vrste, ki predstavljajo vse tri klične liste, to je v endoderm (npr. beta celice pankreasa, hepatociti), v mezoderm (npr. celice kosti, celice maščevja) in v ektoderm (npr. živčne celice). **Peti način** je podoben funkcionalni dokaz pluripotentnosti, ki ga opravimo *in vivo* na poskusnih živalih (tvorba teratomov po

vbriznanju preiskovanih celic v miške SCID, tvorba tkiv vseh treh ključnih listov po vbrizganju preiskovanih celic v živalsko blastocisto).

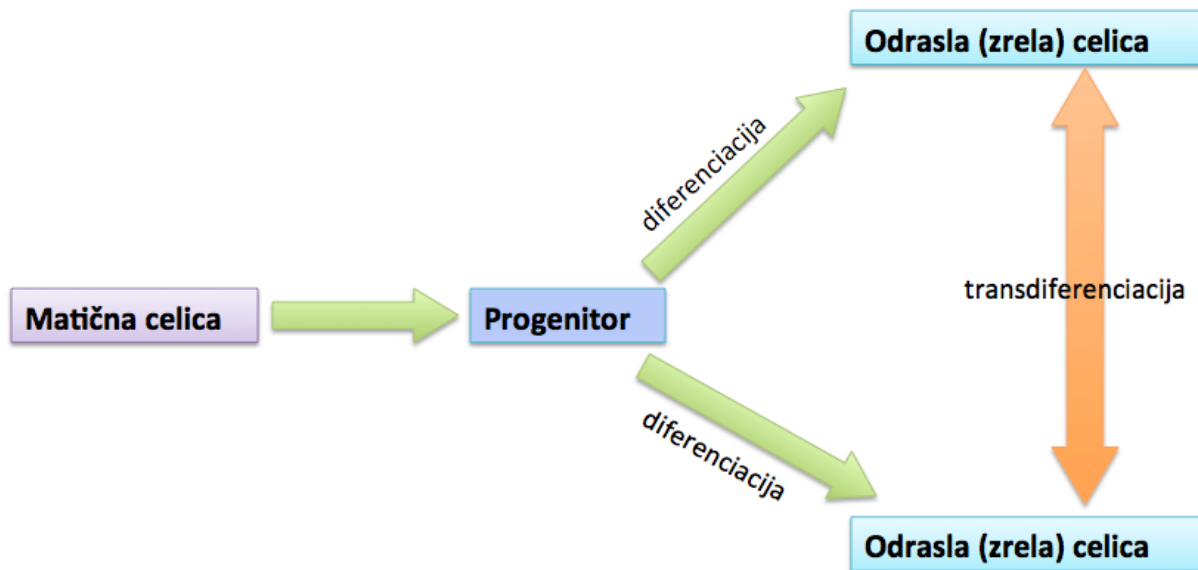
Poleg osnovnih petih metod obstaja še nekaj dodatnih, npr. analiza aktivnosti encima alkalne fosfataze, analiza aktivnosti encima telomeraze, analiza kariotipa, analiza celičnega cikla, analiza epigenetskega profila celic ter druge.

### 3 Diferenciacija matičnih celic in vitro

Diferenciacija je proces, v katerem se manj specializirana celica razvije v bolj specializirano. Diferenciacija poteka stalno med razvojem in rastjo večceličnih organizmov, in pri odraslem organizmu, kjer se različne matične celice delijo in tvorijo hčerinske celice, ki se diferencirajo in skrbijo za nadomeščanje odmrlih celic in popravljanje poškodb. Med diferenciacijo se spremenijo velikost in oblika celice, membranski potencial, presnovna aktivnost in odzivnost na signale. Te spremembe so posledica spremenjenega izražanja genov. Različne celice imajo različno sposobnost diferenciacije. Embrionalne matične celice so pluripotentne in se lahko razvijejo v katero koli celico v organizmu. Odrasle matične celice so pri diferenciaciji že bolj omejene.

Diferenciacija torej naravno poteka med embrionalnim razvojem in kasneje v življenju organizma, trudimo pa se jo posnemati tudi v laboratoriju.

Matične celice imajo sposobnost simetrične delitve – v postopku samoobnavljanja nastaneta iz ene matične celice dve popolnoma enaki nediferencirani celici. Ko se matične celice začnejo diferencirati, preidejo iz simetrične delitve v asimetrično – nastane matična celica in druga bolj specializirana celica, ki nadaljuje zorenje do končnega stadija (slika 6).



**Slika 6: Diferenciacija poteka preko predniških celic (progenitorjev) do končno specializiranih odraslih celic.** Transdiferenciacija je proces, pri katerem se celice iz enega tkiva odraslega spremenijo v specializirane celice drugega tkiva. Mehanizem še ni popolnoma pojasnjen.

**Diferenciacijo v celični kulturi - v *in vitro* pogojih - lahko dosežemo na različne načine:**

- z dodajanjem ali odstranjevanjem topnih sestavin v gojilnem mediju – rastnih dejavnikov (EGF, KGF, TGF-B, FGF, HGF, ...), citokinov (interlevkini, onkostatin-M, GM-CSF, interferoni, ...), vitaminov ali z dodajanjem kalcija,
- z dodajanjem sestavin zunajceličnega matriksa kot so kolagen tipa IV, laminin, fibronektin ali proteoglikani,
- s pripravo mešanih kultur celic, kjer stiki med celicami pripomorejo k celičnemu signaliziranju in komunikaciji oziroma prenosu citokinov in rastnih dejavnikov skozi celično membrano.

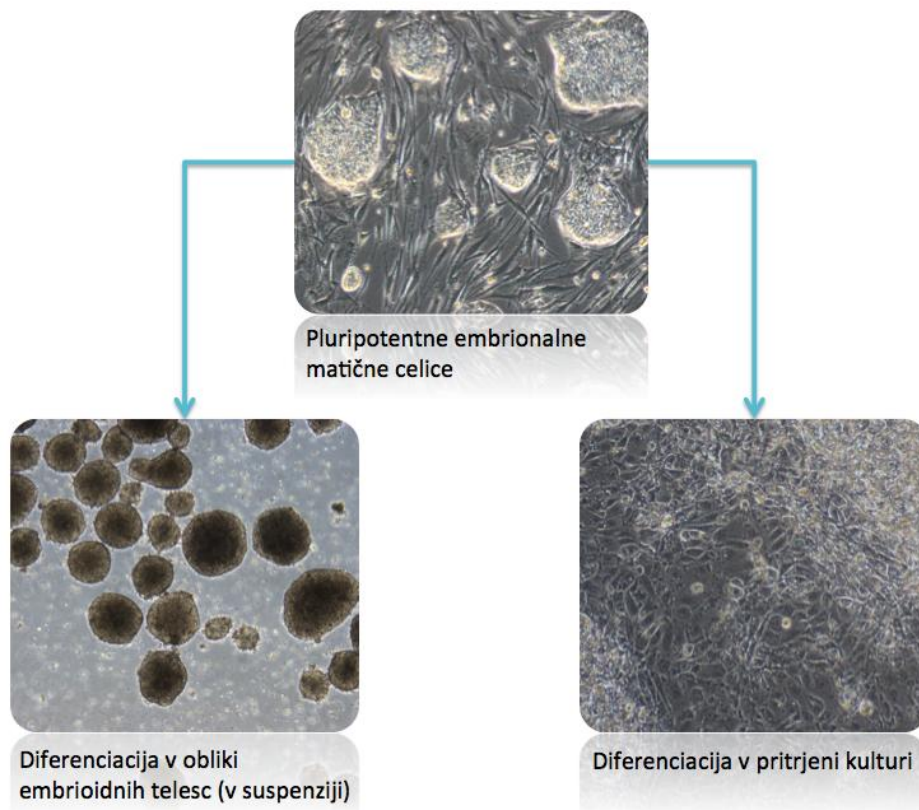
### 3.1 Diferenciacija krvotvornih in mezenhimskih matičnih celic

Krvotvorne matične celice so tiste, ki se v postopku diferenciacije razvijejo v vse vrste krvnih celic in pripomorejo k vzdrževanju števila in razmerja celic v periferni krvi. Krvotvorne matične celice najpogosteje pridobivamo iz periferne krvi, redkeje neposredno iz kostnega mozga. V kostnem mozgu se nahajajo vsaj tri različne populacije matičnih celic, poleg krvotvornih matičnih celic najdemo še mezenhimske (imenovane tudi stromalne) matične celice, endotelijske matične celice, in druge. Mezenhimske matične celice so mešana

populacija celic, ki se lahko razvijejo v celice kosti, hrustanca, maščobnega ali vezivnega tkiva. Diferenciacija *in vitro* – glej dalje vajo. Endotelijske predniške celice so tiste, ki se v postopku angiogeneze razvijejo v žile in kapilare.

### 3.2 Diferenciacija pluripotentnih matičnih celic

Diferenciacijo embrionalnih matičnih celic začnemo tako, da pripravimo embrioidna telesca. Embrioidna telesca po obliki posnemajo zgodnji embrionalni razvoj, v njih pa pride do neusmerjene diferenciacije v celice vseh treh kličnih listov (slika 7).



**Slika 7: Diferenciacija embrionalnih matičnih celic lahko poteka v suspenziji v obliki embrioidnih telesc ali kot pritrjena celična kultura.**

Za pripravo embrioidnih telesc embrionalne matične celice tripsiniziramo, pri tem pazimo, da kolonij ne razbijemo na posamezne celice ter nasadimo v gojilno posodico, ki ne omogoča pritrjevanja celic. Celice nato rastejo v obliki kroglic, lahko do konca obdobja diferenciacije ali pa le prvih nekaj dni, ter jih nato nasadimo na plošče za pritrjanje.

## 4 Tkivno inženirstvo

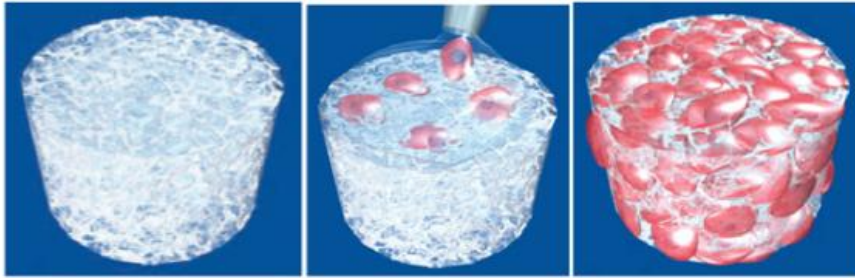
Regenerativna medicina se ukvarja z načini zdravljenja, ki odpravljajo vzroke bolezni in omogočajo vzpostavitev normalne funkcije tkiva ali organa. S tem želimo doseči, da bolnik dokončno ozdravi in ne potrebuje trajnega zdravljenja. To je hitro razvijajoče se interdisciplinarno področje, katerega cilji so obnovitev tkiv s pomočjo celic. V primeru, da celicam dodamo pomožne snovi (**nosilne materiale**, ki usmerjajo razvoj celic v tkivo, lahko že v laboratoriju) oziroma posamezne **biomolekule**, ki vplivajo na migracijo, pomnoževanje, diferenciacijo ali druge aktivnosti celic, in uporabimo **posebne laboratorijske pristope**, govorimo o tkivnem inženirstvu.

Kot je bilo omenjeno že v uvodu, sta pojma tkivno inženirstvo in regenerativna medicina povezana, vendar nimata enakega pomena. Izraz **tkivno inženirstvo** so znanstveniki začeli uporabljati ob koncu 80. let 20. stoletja, ko so v laboratorijih začeli pripravljati kožne nadomestke. Ta dosežek je pomenil revolucijo v medicini, saj je omogočil zdravljenje hudih opeklin in je reševal življenja. Kožni nadomestek sestavljajo keratinociti, ki so glavne celice povrhnjice kože in primerna nosilna podlaga za celice. To je bil začetek tkivnega inženirstva.

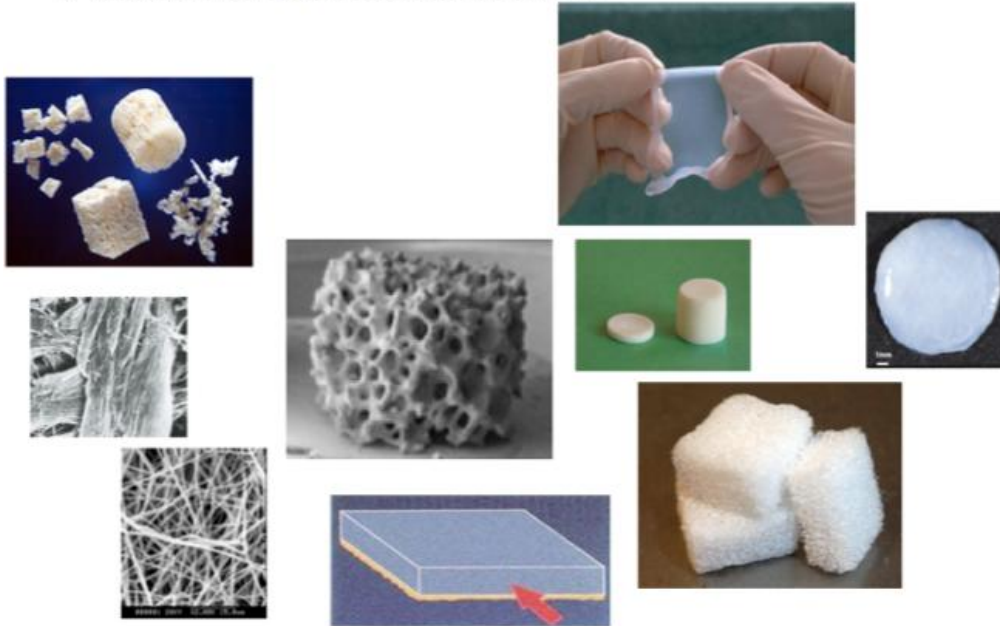
### LASTNOSTI NOSILCEV:

- primerna **poroznost**, da celice lahko prehajajo v notranjost nosilca,
- primerna **površina**, ki omogoča pritrditev, pomnoževanje in diferenciacijo celic,
- **biokompatibilnost** oziroma dober stik s tkivom v telesu. Biokompatibilnost je sposobnost pravilnega odziva materiala v odnosu do gostitelja v specifičnih aplikacijah. Površinska kompatibilnost pomeni kemijsko, biološko in fizikalno usklajenost vsadka z gostiteljskim telesom. Strukturna kompatibilnost predstavlja optimalno prilagoditev mehanskemu obnašanju gostiteljskega tkiva.
- **biorazgradljivost**,
- po vsaditvi mora biorazgradljivi nosilec ohraniti **mehanske lastnosti**, dokler ni več potreben, nato se mora **absorbirati in izločiti iz telesa**, ne da bi pustil sledi,
- nosilec **ne sme povzročati vnetnega ali toksičnega odziva organizma**,
- nosilec naj bi bilo **enostavno sterilizirati**,
- možnost, da ga **oblikujemo v želeno obliko**.

A) Nosilci nudijo celicam 3D okolje.



B) Biomateriali so lahko naravni ali umetni.



**Slika 8: Različne oblike nosilcev.** Nosilci nudijo celicam ustrezno okolje. Kot biomateriali se uporabljajo se različne naravne (svila, kolagen, alginat, apatit) in umetne snovi (keramika, različne kovine, polimeri).

#### 4.1 PRIMER tkivnega inženirstva: Kako sestaviti srce v laboratoriju

V teoriji je celoten postopek zelo enostaven. Najprej z darovanih organov (ne nujno človeških) odstranimo vse celice ter tako pridobimo proteinski nosilec, na katerega nasadimo celice, ki so bolniku imunsko skladne (slika 9).

V praksi pa se znanstveniki srečujejo z mnogimi izzivi. V laboratoriju so že uspešno vzgojili in presadili enostavne votle organe (sapnik, kirurg Paolo Macchiarini z Univerze v Barceloni, sečni mehur prof. Atala iz ZDA). Vzgojanje zapletenejših organov, kot so ledvice ali pljuča, pa pomeni, da se mora na pravih mestih nahajati več deset različnih vrst celic, hkrati pa je potreben razvoj kompleksne mreže krvnih žil, ki te celice preskrbujejo s kisikom in hranili. Ti organi morajo biti sterilni, sposobni rasti, če jih presadimo otrokom, ter sposobni regeneracije. Najpomembneje je, da delujejo - idealno - celo življenje.

Srce je življenjskega pomena in je tretji najbolj potrebovan organ (za ledvicami in jetri) za presaditev. Samo v ZDA je na čakalni listi za presaditev srca 3500 bolnikov. Priprava srca v laboratoriju pa je zelo zahtevna. Srce na dan prečrpa okrog 7000 litrov krvi, sestavljeno je iz več votlin ter zaklopk in različnih vrst celic. Pri razvoju srca v laboratoriju so pomembne tri ključne komponente: nosilec, vir celic za gojenje *in vitro*, ter pogoji, s katerimi lahko ustvarimo celice, ki so po funkciji enake tistim v normalnem srcu.

## Nosilec

V srcu so celice urejene v ustrezno strukturo, ki je tako zapletena, da je 3-D tiskalniki še ne morejo natisniti. Zato je za raziskovalne namene najpogostejša uporaba ti. »decelulariziranega srca« – iz matriksa s posebnimi postopki v laboratoriju odstranijo vse celice. Skozi srčne žile več dni črpajo detergent. Na ta način odstranijo lipide, DNA, topne proteine, sladkorje in skoraj ves celični material. Ostane mreža, sestavljena iz kolagena, laminina in drugih strukturnih proteinov. Ni nujno, da je nosilec človeški, zelo obetavni so tudi prašičji. S preizkušanjem različnih pogojev v postopku decelularizacije so razvili zelo uspešen postopek za pripravo ustreznih nosilcev. Vendar je to šele prvi korak, v naslednjem je potrebno na nosilec nasaditi humane celice.

## Celice

Pri nasaditvi celic se najprej srečamo z več vprašanji: **Katere celice uporabiti? Koliko celic potrebujemo? Ali naj uporabimo zrele celice, embrionalne matične celice ali celice iPS?** Vsaka vrsta celic ima svoje slabosti in prednosti. Že več kot desetletje znamo v laboratoriju embrionalne matične celice spremeniti v funkcionalne srčno-mišične celice (kardiomiocite), z zunanji električnimi signali lahko krčenje teh celic tudi sinhroniziramo. Večina raziskovalcev uporablja mešanico več vrst celic – npr. endotelijske predniške celice, ki so pomembne za razvoj žil, in mišične predniške celice, ki tvorijo srčno mišico. Pri uporabi odraslih celic je težava njihova omejena sposobnost za pomnoževanje, saj se lahko delijo le omejeno mnogokrat preden se postarajo. Različne vrste celic lahko izoliramo iz tkiva ali pa pridobimo z diferenciacijo matičnih celic. Celice iPS so zelo zanimive, ker lahko teoretično iz njih pridobimo vse vrste celic, ki jih potrebujemo v srcu, ki so hkrati imunsko skladne z bolnikom. V praksi se srečamo s težavo, kako v laboratoriju vzgojiti več milijard celic, ki jih potrebujemo za nasaditev na nosilec. Razvoj na področju celičnih kultur gre v avtomatizacijo gojenja celic, kar bo verjetno v prihodnosti, ko bo ta tehnologija cenovno dostopnejša, rešilo to težavo.

Druga težava je ožiljanje tkivno inženirskih presadkov. Ena izmed strategij je, da pričakujemo, da se bodo po presaditvi žile same vrasle v presadek. Zaradi pomanjkanja kisika v nosilcu celice izločajo rastne dejavnike, ki spodbujajo razvoj žil. Dodatno lahko ožiljanje pospešimo z dodajanjem ravnih dejavnikov VEGF, ki je ključen regulator neovaskularizacije in bFGF, ki je pomemben pri proliferaciji endotelijskih celic. Preden na nosilec nasadimo celice ga dobro speremo z oksigeniranim medijem, da v nosilcu zagotovimo kisik, hranila in ustrezen pH. Celice na decelularizirano srce nasadimo tako, da skozi srčne žile črpamo celično

suspenzijo ali pa jih z iglo vbrizgamo na različna mesta. Počakamo, da se celice pritrđijo nato sledi perfuzija gojilnega medija skozi srce. Ta postopek ni idealen, saj se vse celice ne pritrđijo in prihaja do izgub.

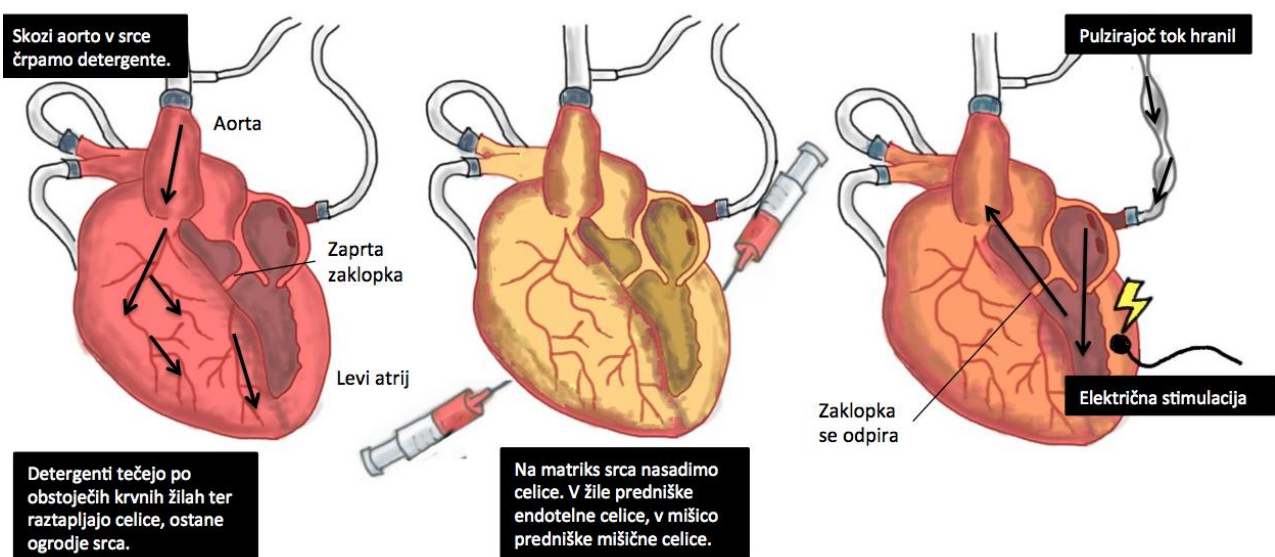
Celice se torej pritrđijo na nosilec, začno se deliti in diferencirati. Da celice postanejo funkcionalni kardiomiociti potrebujemo več kot le gojilni medij z rastnimi dejavniki. Zelo pomembno je namreč okolje, ki s svojo trdoto, obliko, mehanskim stresom in drugimi lastnostmi pomembno vpliva na celice in jih usmeri v določeno razvojno smer. Ko nosilec naselimo s celicami, ga naprej gojimo v napravi, imenovani bioreaktor, ki posnema pogoje, ki nastanejo ob bitju srca. Uporabljamo tudi električne signale, s katerimi sinhroniziramo utripanje srčnih celic (podobno kot delujejo srčni spodbujevalniki) ter črpalko, ki fizično posnema gibe ob krčenju srčne mišice.

Po 8 do 10 dneh so umetna srca sposobna sama biti. Na začetku poskusov je tako srce imelo približno 2% črpalne funkcije normalnega odraslega podganjega srca. Z izboljšavami in optimizacijo postopkov so od takrat uspeli doseči 25% normalne funkcije pri podganah in drugih večjih sesalcih.

## Utrip

Na koncu v laboratoriju vzgojeno srce presadimo v organizem. Prva težava na tem koraku je integriteta žil. Pomembno je, da je endotelij žil intakten, da ne prihaja do puščanja in tvorbe strdkov, ki so lahko usodni za organ ali za prejemnika. Srca iz laboratorija so v različnih poskusih presadili živalim v vrat, trebuh ali v bližino njihovega srca. Pokazali so, da se ti organi lahko krčijo, vendar pa še niso sposobni prevzeti celotne črpalne funkcije.

### V laboratoriju vzgojeni organi



Slika 9: V laboratoriju vzgojeno srce.



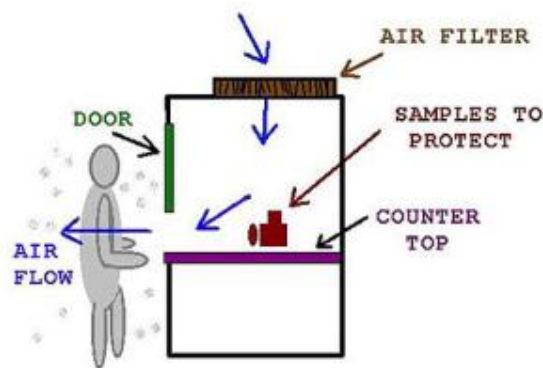
## 5 Laboratorij za celično biologijo

Za gojenje celic v laboratoriju potrebujemo posebno opremo, ki nam omogoča aseptično delo s celicami, njihovo opazovanje in gojenje v pogojih, ki posnemajo tiste v telesu. Laboratoriji se po opremi razlikujejo, vsi pa vsebujejo osnovno opremo.

### 5.1 Osnovna oprema

#### Brezprašna komora

Za vzdrževanje aseptičnih pogojev in ohranjanje "sterilnosti" (odsotnosti živih organizmov) materiala uporabljamo brezprašno komoro z laminarnim tokom ali laminarij. Laminarij, znan tudi pod imenom čisto delovno mesto, je zaščitna komora, ki na delovno mesto dovaja zrak prefiltriran skozi HEPA (ang. High Efficiency Particulate Air) filter in preprečuje vstopanje nefiltriranega zraka kljub odprtini za roke. V njem izvajamo različne manipulacije s celicami in tkivi, kot so menjava medija, presajanje celic in drugo.



Slika 10: Primer brezprašne komore in njenega delovanja.

#### CO<sub>2</sub> inkubator

Danes so CO<sub>2</sub> inkubatorji nepogrešljiv del opreme celičnega laboratorija. Namenjeni so gojenju celic in tkivnih kultur. Inkubator zagotavlja pogoje, ki posnemajo pogoje v telesu sesalcev, in tako omogoča preživetje, pomnoževanje in diferenciacijo celic. Uravnani parametri v inkubatorju so: delni tlak CO<sub>2</sub>, temperatura in relativna vlažnost. Nadzorovani parametri omogočajo stalen pH (7.2 – 7.4), stabilno temperaturo (37°C), visoko relativno vlažnost (95 %) in nadzorovan delni tlak CO<sub>2</sub> (5 %). Zračno vlago zagotavlja vodni rezervoar na dnu inkubatorja, ki ga je treba redno polniti in dodajati dezinfekcijska sredstva. Paziti moramo, da se celice čim krajši čas nahajajo izven inkubatorja, prav tako ne smemo puščati vrat inkubatorja odprtih predolgo časa.

## Mikroskop

Celice gojimo v gojilnih posodicah, njihovo opazovanje med gojenjem je mogoče s spodnje strani gojilne posode, brez poseganja v celično kulturo. Zato potrebujemo invertni mikroskop, kjer se objektiv nahaja pod mizico in so usmerjeni navzgor. Pri navadnem mikroskopu so namreč nameščeni nad mizico in so usmerjeni navzdol. Mikroskop naj bo v prostoru čim bliže inkubatorja, da celice čim manj prenašamo.

## Centrifuge

Centrifuge uporabljamo za odstranjevanje gojišča ali drugega medija oziroma za koncentriranje celic.

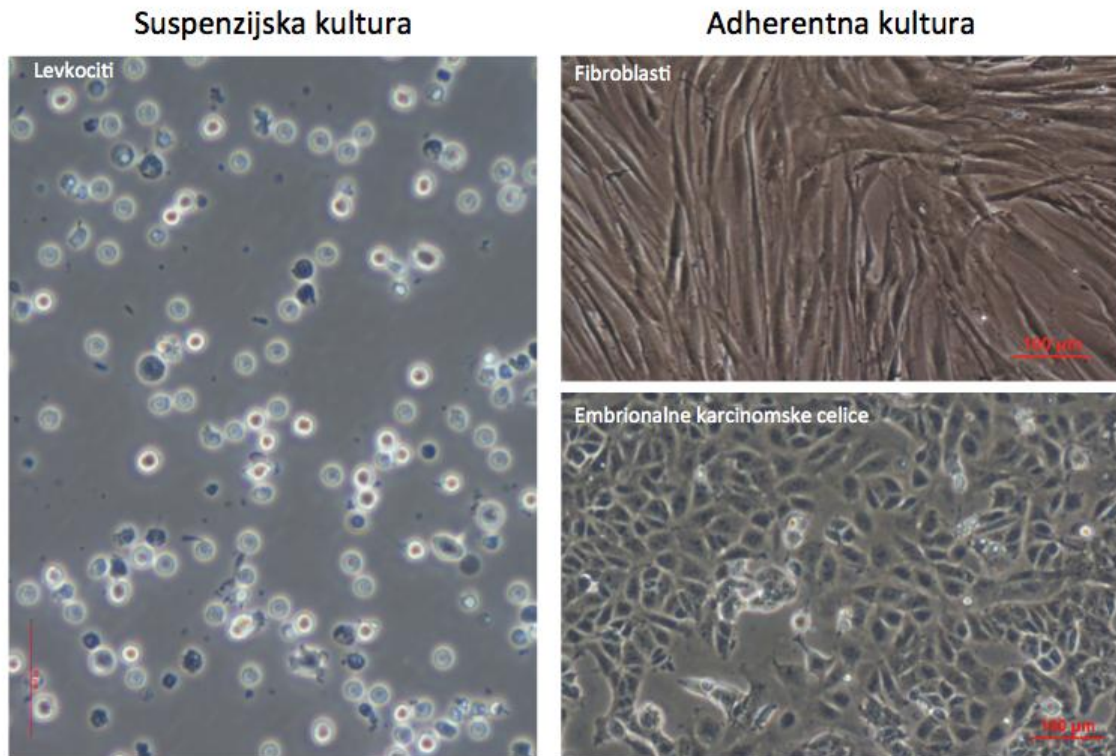
# 6 Celične kulture

## 6.1 Priprava celične kulture

Ključni dejavniki pri rokovanju s celicami so izbira vira celic, njihova izolacija ali osamitev in priprava celične kulture. Tkiva in celice, ki nam služijo kot vir celic za celično kulturo, odvezamo v aseptičnih pogojih, vse stopnje predelave celic dokumentiramo. Zagotoviti moramo, da bo ravnanje s celicami potekalo v pogojih, ki bodo čim bolj zmanjšali možnost okužb.

Osnovni obliki gojenja celic (slika 11):

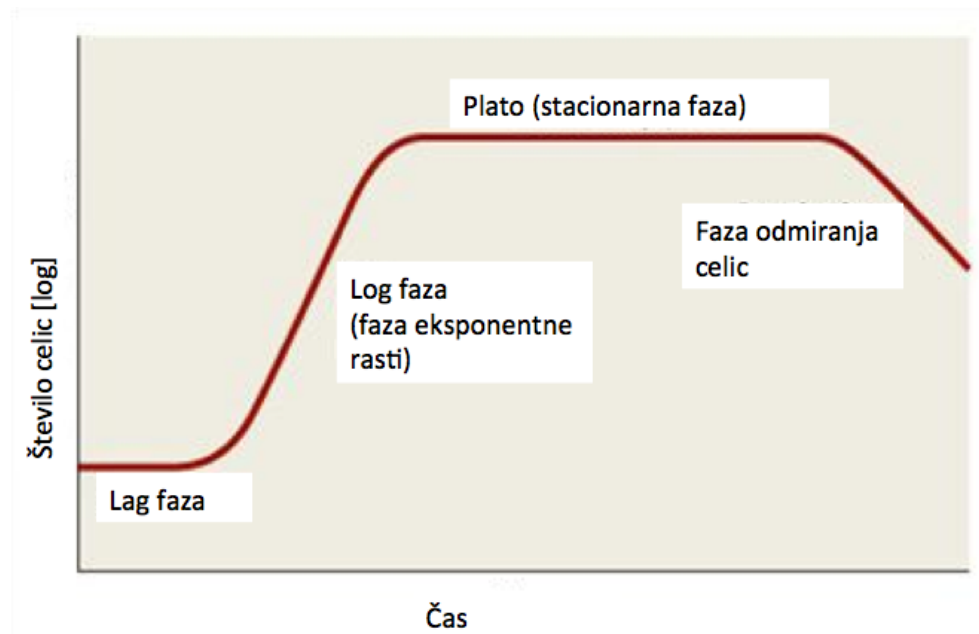
1. **Suspenzijska kultura.** V suspenzijski kulturi se celice ne pritrdijo na dno gojilne posodice, ampak plavajo v mediju. Celice v suspenzijski kulturi hranimo tako, da v obstoječo kulturo dodajamo sveže gojišče in jo tako redčimo s svežim medijem. Lahko pa celice centrifugiramo, odstranimo izrabljeni medij in ga nadomestimo s svežim.
2. **Adherentna kultura.** Celice v adherentni kulturi so pritrjene na dno gojilne posodice, zato gojilni medij menjujemo tako, da odstranimo star medij in ga nadomestimo s svežim.



**Slika 11: Suspensijska in adherentna celična kultura.** Določene vrste celic se pri gojenju v laboratoriju pritrdijo na podlago (kožne celice) medtem, ko druge (npr. krvne celice) ostanejo v suspenziji.

Koncentracijo celic izračunamo na volumsko enoto (mL gojišča). Gostoto pritrjenih celic v gojilni posodi izračunamo na površinsko enoto (cm<sup>2</sup>). Skušamo doseči, da celice vedno nasadimo pri isti gostoti in jih tudi gojimo do iste gostote. Gostota celic in intenzivnost stika med njimi namreč vplivata na njihovo morfologijo.

Čas od priprave celične kulture (nasaditve celic) do začetka njihove eksponentne rasti imenujemo »lag« faza. Fazo, v kateri celice eksponentno rastejo (od »lag« faze pa do faze, ko rastna krivulja doseže plato – rast celic se ustavi), imenujemo logaritemska (»log«) faza rasti (število celic se eksponentno povečuje) (slika 12).



**Slika 12: Rastno krivuljo celične kulture sestavljajo štiri faze:** »lag« faza ali faza prilagajanja celic na novo okolje, »log« faza ali faza eksponentne rasti. Po nekem času pride do izrabe hranil v mediju in rast celic doseže plato – se ustavi. Če celic ne presadimo, oziroma jim ne dodamo novih hranil in ostalih pogojev za rast, lahko začno tudi odmirati.

Senescenca ali biološko staranje je posledica določenega števila celičnih delitev. Senescenca pomeni ustavitev celičnega cikla. Danes poznamo več vzrokov zanjo: krajšanje telomer, reaktivne kisikove spojine, poškodbe DNA, aktivacija določenih onkogenov,... Običajno se pri normalnih diploidnih celicah to *in vitro* zgodi po 50 podvojitvah.

## 6.2 Presajanje celic

Ko celice v kulturi dosežejo gostoto, ki zavira njihovo nadaljnjo rast oziroma pomnoževanje (običajno nekje pri 80 % preraščene površine gojilne posode), moramo celice presaditi. Idealno je namreč, da celice presadimo, ko so semi-konfluentne (dno gojilne posode še ni popolnoma prekrito s celicami) in so torej še vedno v »log« fazi rasti. Celice, ki dosežejo konfluentno stanje, včasih po presaditvi potrebujejo daljšo lag fazo, nekatere pa si nikoli ne opomorejo.

Pri presajanju celic uporabljamo različne postopke, s katerimi odlepimo celice s površine gojilne posode:

- **mehansko** – s plastičnim strgalom postrgamo celice s površine. Ta postopek je hiter in enostaven, vendar poškoduje celice in lahko povzroči njihovo odmiranje. Uporaben je, kadar želimo pridobiti velik vzorec celic za pripravo različnih ekstraktov, pri čemer viabilnost celic ni pomembna, ali za pripravo celic za molekularne analize
- **proteolitični encimi** – tripsin, kolagenaza ali pronaza se navadno uporabljajo v kombinaciji z EDTA (ang. Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid). Encimi odlepijo celice s podlage oziroma drugo od druge. Postopek je hiter in zanesljiv, vendar lahko poškoduje površino celic, ker encimi razgradijo izpostavljene proteine na površini.

Proteolitično reakcijo ustavimo z dodatkom medija s serumom, ki vsebuje inhibitorje encimov.

- **EDTA** – za odlepljanje celic s površine lahko uporabimo tudi samo raztopino EDTA. Do celic je nežnejša kot tripsin, vendar ni tako učinkovita. EDTA veže (kelira)  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$  ione. Ti ioni so potrebni za pritrnitev celic na površino. Ker v kompleksu z EDTA niso več dostopni celici, se le ta odlepi. V poskusih, kjer potrebujemo takojšnje ponovno pritrjanje celic, je EDTA boljša kot tripsin. Če uporabimo tripsin, ki razgradi adhezijske molekule, je namreč potrebno nekaj časa, da se te molekule ponovno sintetizirajo, prenesejo na površino celice in da se celica ponovno pritrdi.

## 7 Medij in rastni pogoji

### 7.1 Fiziološki parametri

- temperatura – sesalske celice 37 °C
- pH medija med 7.2 – 7.5
- vlažnost
- zračna faza – koncentracija  $\text{CO}_2$ , ki se raztopi v mediju je odvisna od delnega tlaka  $\text{CO}_2$  v zraku in temperature. V mediju se nahaja natrijev bikarbonat, ki skupaj z raztopljenim  $\text{CO}_2$  ustvarja puferski sistem in stabilizira pH in ga ohranja med 7.2 – 7.5.
- vidna svetloba lahko slabo vpliva na celice. V nekaterih medijih lahko pride do nastajanja toksičnih spojin pod vplivom svetlobe. Celice zato gojimo v temi in jih svetlobi izpostavimo čim manj.

### 7.2 Sestava medija

- ioni:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  (bikarbonatni ion)
- elementi v sledovih: železo, cink, selen
- sladkorji: najpogosteje uporabljamo glukozo
- aminokisliline: 13 esencialnih
- vitamini: B, A, E, riboflavin, tiamin, biotin
- holin, inozitol
- serum – je dodatek h gojiščem za gojenje celic, ki ga pridobivajo iz seruma nerojenih telet. Kot dodatek h gojiščem ga uporabljamo zato, ker vsebuje malo protiteles in veliko rastnih dejavnikov. Glavna komponenta je globularni protein serumski albumin, vsebuje pa tudi veliko drugih proteinov, ki ugodno vplivajo na preživetje, rast in pomnoževanje celic v kulturi.
- antibiotiki – niso nujno potrebna sestavina, a se pogosto uporabljajo za preprečevanje rasti bakterij in gliv

Gojilni medij menjamo 2-3 x tedensko.

### 7.3 Opazovanje rasti celične kulture ter živosti celic

Celice v suspenziji so okrogle in simetrične, adherentne celice pa se pritrdijo na podlago in razpotegnejo po njej. Celice opazujemo v sami celični kulturi z invertnim mikroskopom, le redko pa na ta način lahko ločimo žive celice od mrtvih.

Zato živost ali viabilnost celic med gojenjem določamo na vzorcu celic, najpogosteje z uporabo barvila tripansko modro, ki vstopa v mrtve celice in jih obarva modro, žive pa ostanejo svetle. Celice preštujemo s hemocitometrom pod mikroskopom ali s celičnim števcem.

Pri celičnih pripravkih, ki so namenjeni zdravljenju in jih ne uporabljamo le v raziskovalne namene, moramo še posebej paziti na njihovo **kakovost**. V ta namen dnevno spremljamo celično morfologijo, preverjamo celični genotip (da ne pride do zamenjave celic bolnikov), celični fenotip, živost in apoptotičnost celic, mikrobiološko sterilnost, prisotnost mikoplazem ter bakterijskih endotoksinov. Prav tako med celotnim postopkom nadzorujemo kakovost uporabljenih materialov ter uporabljamo le validirano laboratorijsko opremo.

## 8 Vaja 1 in 2: Postopki ločevanja in fenotipizacije celic

### 1. POSTOPKI LOČEVANJA CELIC

Tako pri pripravi celic za zdravljenje, kot tudi pri raziskavah različnih celic, je ločevanje določene vrste celic od drugih eden izmed prvih postopkov, s katerim se srečamo. Pri uporabi celic v terapevtske namene je mnogokrat ključnega pomena, da zagotovimo presaditev točno določene populacije celic, s katero dosežemo kar najboljši terapevtski učinek. Podobno je pri gojenju, karakterizaciji in preučevanju fiziologije določene celične vrste, kjer je pomembno, da izoliramo dovolj čisto populacijo celic, tako da pri analizi ne zaznavamo signalov, ki so posledica kontaminacije z ostalimi vrstami celic.

Osnovne lastnosti, na podlagi katerih ločujemo celice, so njihova velikost, zrnatost, gostota, izražanje površinskih in znotrajceličnih antigenov ter sposobnost pritrjevanja celic na različne vrste podlag.

V grobem lahko razdelimo postopke ločevanja na tiste, ki temeljijo na **fizikalnih lastnostih celic**, in tiste, ki **izkoriščajo vezavo afinitetnih molekul** na celice, povečini so to protitelesa. Pri ločevanju celic je ključnega pomena, da med samim postopkom celic ne poškodujemo ter ohranimo njihovo viabilnost in biološke funkcije. Postopki ločevanja celic se med seboj razlikujejo po hitrosti obdelave, izkoristku in čistosti izolirane populacije celic.

V prvo skupino, pri katerih ločevanje poteka glede na fizikalne lastnosti celic, uvrščamo postopke filtracije in gradientnega centrifugiranja. Pri teh postopkih v kratkem času obdelamo veliko število celic in običajno služijo kot prva stopnja pri izolaciji celic. Z uporabo filtrov z določeno velikostjo por lahko tako na primer ločimo posamezne celice od delcev tkiva ali skupkov celic. Pri gradientnem centrifugiranju ločujemo celice na podlagi njihove gostote. Na ta način npr. v vzorcu krvi ločimo celice z jedrom od eritrocitov in trombocitov.



**Slika 13: Filtri različnih velikosti por v obliki nastavkov za centrifugirke.**

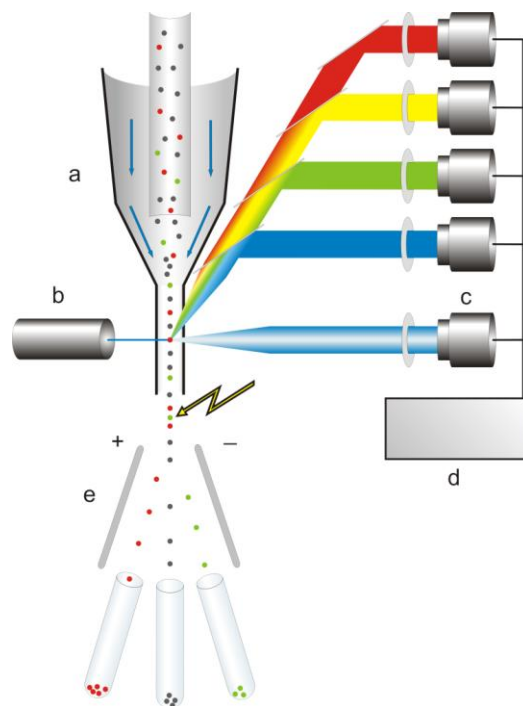
Za izolacijo manjših populacij celic uporabljamo afinitetne metode ločevanja celic. Največkrat se v te namene uporabljajo protitelesa proti antigenom na površini celic, ki jih imenujemo tudi **molekule CD** (ang. Cluster of Differentiation). To so adhezijske molekule, receptorji, encimi ali druge molekule, ki se lahko izražajo le v določeni stopnji razvoja celice in v določenih pogojih. Mnoge od teh molekul so dobro opredeljene z biokemijskega in molekularno genetskega vidika, poznana so njihova aminokislinska zaporedja in vsaj v

grobem tudi njihova biološka vloga. Poleg površinskih antigenov razlikujemo vrste celic ali njihovo aktivnost z določitvijo znotrajceličnih antigenov, kot so npr. transkripcijski dejavniki, citokini, encimi, gradniki citoskeleta in druge molekule, ki se nahajajo v notranjosti celice. V tem primeru celično membrano najprej poškodujemo ali permeabiliziramo (najpogosteje z detergenti), da lahko barvilo, s katerim označujemo omenjene molekule, preide v citoplazmo.

V primeru **pozitivne selekcije** iz populacije celic ločimo zgolj tiste celice, ki izražajo določen antigen. Pogosto pa se poslužujemo tudi **negativne selekcije ali deplecije**, pri kateri iz celične suspenzije odstranimo vse nezaželene vrste celic. Pri zahtevnejših izolacijah celic lahko uporabimo oba principa.

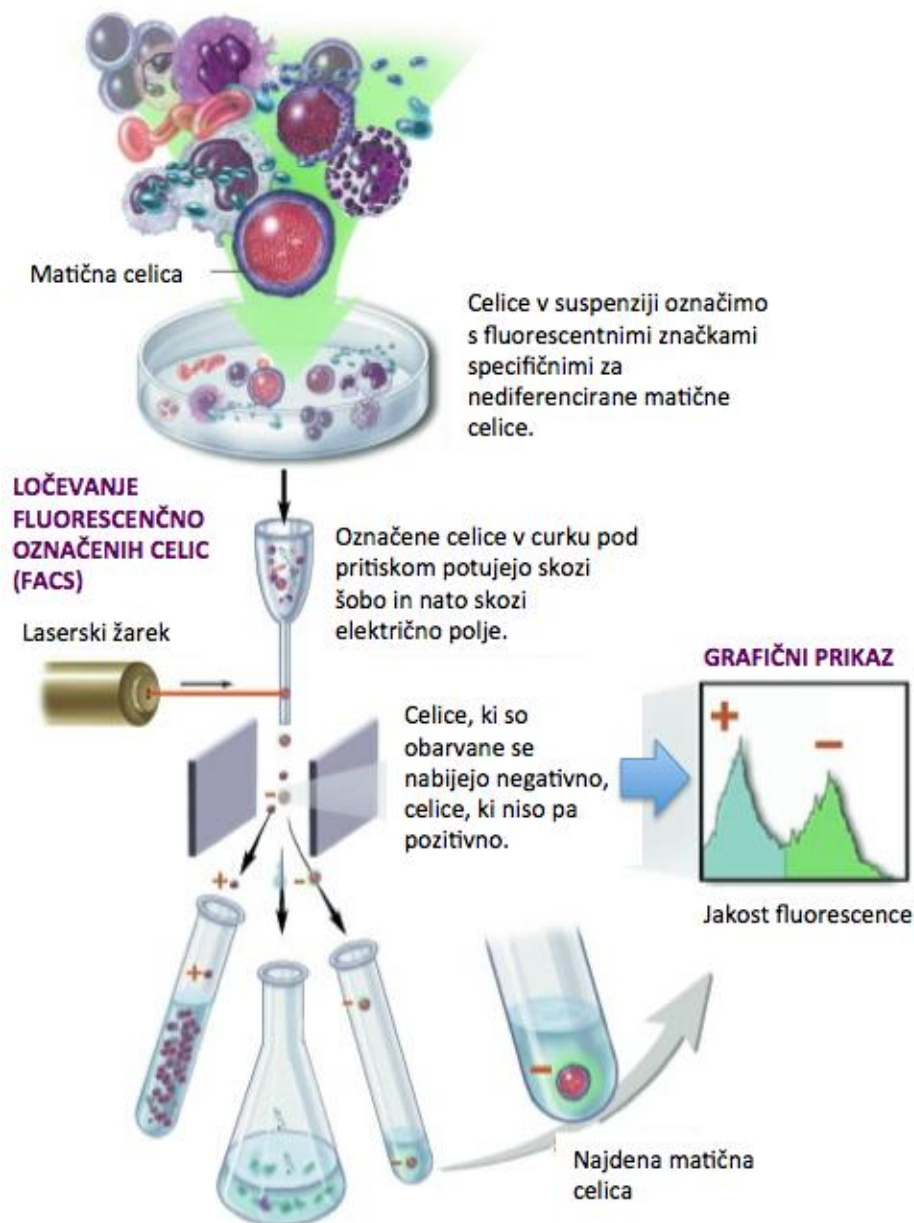
## Uporaba pretočne citometrije za fizično ločevanje celic

**Celični sorter** ali ločevalnik je posebne vrste pretočni citometer (princip delovanja pretočnega citometra glej v poglavju Fluorescenčna mikroskopija in pretočna citometrija), s katerim **fizično** ločujemo populacije celic ali celo izločimo eno celico od ostalih celic v suspenziji. Običajni pretočni citometer se namreč uporablja le za **analize** celičnih suspenzij, gre torej za »ločevanje« celic na grafih. Pri celičnem ločevalniku pa celice najprej analiziramo s pomočjo različnih grafov in na podlagi morfologije in fluorescence označimo populacijo celic, ki jo fizično želimo ločiti od ostalih celic. Najbolj razširjeni so celični ločevalniki, pri katerih curek suspenzije vibrira in tvori kapljice, v katerih se nahajajo posamezne celice. Kapljica, ki vsebuje izbrano celico, prejme električni naboj in se odkloni od preostalega curka, ko potuje mimo plošč z visoko napetostjo. Nato ločene celice zbiramo v epruvetah ali mikrotiterskih ploščicah.



**Slika 14: Osnovni deli celičnega ločevalnika:** a) pretočna komora, kjer posamezne celice vstopajo v optični sistem; b) laser aktivira fluorescenčne molekule; c) detektor zazna fluorescenčno svetlobo; d) računalnik; e) plošči z visoko napetostjo.





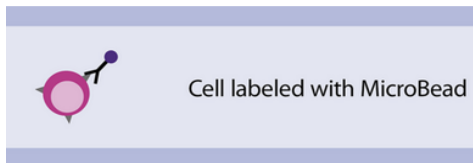
**Slika 15:** Ločevanje matičnih celic od ostalih celic v suspenziji s celičnim ločevalnikom (celičnim sorterjem).

### Izolacija celic z vezavo na magnetne delce

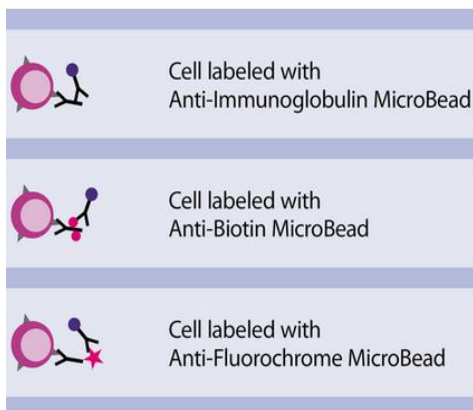
Protitelesa lahko neposredno ali posredno vežemo tudi na trdno matrico, kot so različni delci, ali vlakna, in tako postanejo »lovilci« določenih celic iz celične suspenzije. Celice, vezane na trdno podlago, ob koncu izolacije speremo z uporabo mehanske sile, posebnih pufrov za izpiranje ali pa s spreminjanjem tridimenzionalne oblike nosilca. Trenutno se najpogosteje uporabljajo protitelesa vezana na magnetne delce, ki nam omogočajo ločevanje v magnetnem polju (npr. MACS, ang. Magnetic Activated Cell Sorting). Celice označene z magnetnimi delci po odstranitvi iz magnetnega polja enostavno zberemo v epruvete brez uporabe dodatnih postopkov, ki bi lahko negativno vplivali nanje.

Magnetni delci so lahko vezani neposredno na primarna protitelesa. V uporabi pa so tudi različni sistemi posredne vezave. Na neoznačena, z biotinom ali različnimi flourokromi konjugirana primarna protitelesa, lahko vežemo sekundarna protitelesa, konjugirana z magnetnimi delci, ki so specifična za določene izotipe protiteles, biotin ali flourokrome. Za vezavo na biotinilirana protitelesa lahko uporabimo tudi magnetne delce, vezane na streptavidin, ki predstavlja le eno izmed možnosti posrednega načina vezav.

### Direct magnetic labeling



### Indirect magnetic labeling



**Slika 16: Neposredna in posredne vezave magnetnih delcev (MicroBead) na celice (levo).** Kolona za ločevanje manjših količin celic, v katero naneseemo suspenzijo celic (desno zgoraj) in magnetno stojalo za kolone (desno spodaj).

Magnetni delci se razlikujejo tudi po velikosti. Pri uporabi polistirenskih magnetnih delcev velikosti od 1 do 5  $\mu\text{m}$  lahko celice ločujemo kar v centrifugirkah ali epruveh. Ko suspenzijo z označenimi celicami izpostavimo magnetnemu polju, se celice pomaknejo ob steno. Magnetna sila je tako močna, da zadrži označene celice ob steni, tudi ko odstranjujemo suspenzijo z ostalimi celicami. Tako velike delce je za nadaljnjo uporabo celic priporočljivo odstraniti z njihove površine, saj bi lahko bodisi motili analize, ovirali biološko funkcijo celic, pri uporabi v terapevtske namene pa ogrozili zdravje pacienta. Poznamo tudi manjše magnetne delce velikosti od 50 do 90 nm iz sredice iz železovega oksida in ovoja iz biorazgradljivih materialov, kot so dekstran, škrob in hitozan. Zaradi manjše velikosti in biorazgradljivosti takšnih magnetnih delcev po ločevanju največkrat ne odstranjujemo s površine celic. Manjše so tudi magnetne sile, ki nastanejo, ko te delce izpostavimo magnetnemu polju. Za ločevanje celic so tako potrebne dodatne kolone z matrico, ki poveča magnetne sile, ki delujejo na celice. V neposredni bližini matrice je namreč magnetno polje močnejše, kar omogoči zadrževanje tudi šibko označenih celic.

## 2. POSTOPKI FENOTIPIZACIJE CELIC

### Fluorescenčna mikroskopija in pretočna citometrija

Klasična metoda za določanje celičnih antigenov je fluorescenčna mikroskopija, pri kateri s fluorescenčnim barvilom označena monoklonska protitelesa pomešamo s celicami, nato pa s fluorescenčnim mikroskopom opazujemo obarvanost celic. Vezavo fluorescenčno označenih protiteles na celice lahko ugotovljamo tudi s pretočno citometrijo, ki je nadgradnja metode statične fluorescenčne mikroskopije. Za razliko od mikroskopije je pretočna citometrija hitrejša in objektivnejša, saj lahko analiziramo lastnosti velikega števila posameznih celic, ki s hitrostjo nekaj sto celic na sekundo druga za drugo potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe. Celico lahko hkrati obarvamo z več različnimi fluorokromi, pri tem pa moramo izbrati takšne kombinacije fluorokromov, ki oddajajo svetlobo različnih valovnih dolžin, da jih med seboj lahko ločimo.

### Fluorescenčno označevanje celic

#### **Neposredno (direktno) imunofluorescenčno označevanje:**

Pri neposrednem imunofluorescenčnem označevanju celic uporabljamo protitelesa, ki imajo barvila – fluorokrome vezana neposredno na protitelo proti želenemu antigenu. Postopek označevanja poteka enostopenjsko, s tem se izognemo nespecifični vezavi sekundarnega protitelesa.

#### **Posredno (indirektno) označevanje:**

Postopek označevanja poteka v dveh stopnjah. V prvi stopnji celice inkubiramo s primarnimi protitelesi, ki ne vsebujejo fluorokromov. V drugi stopnji pa dodamo sekundarna, s fluorokromom označena protitelesa, ki se specifično vežejo na primarna protitelesa. Za razliko od direktnega označevanja lahko pri indirektnem sestavljamo različne kombinacije fluorokromov.

#### **Označevanje antigenov znotraj celice:**

Uspešnost označevanja znotrajceličnih antigenov je odvisna od številnih dejavnikov; fiksacije celic, permeabilizacije in količine protiteles – titracija. Vsekakor je za pravilne rezultate nujno potrebna optimizacija postopkov označevanja celic in v primeru uporabe pretočne citometrije dobro poznavanje delovanja aparature. Pri označevanju znotrajceličnih antigenov se skušamo izogniti uporabi posrednega (indirektnega) označevanja.

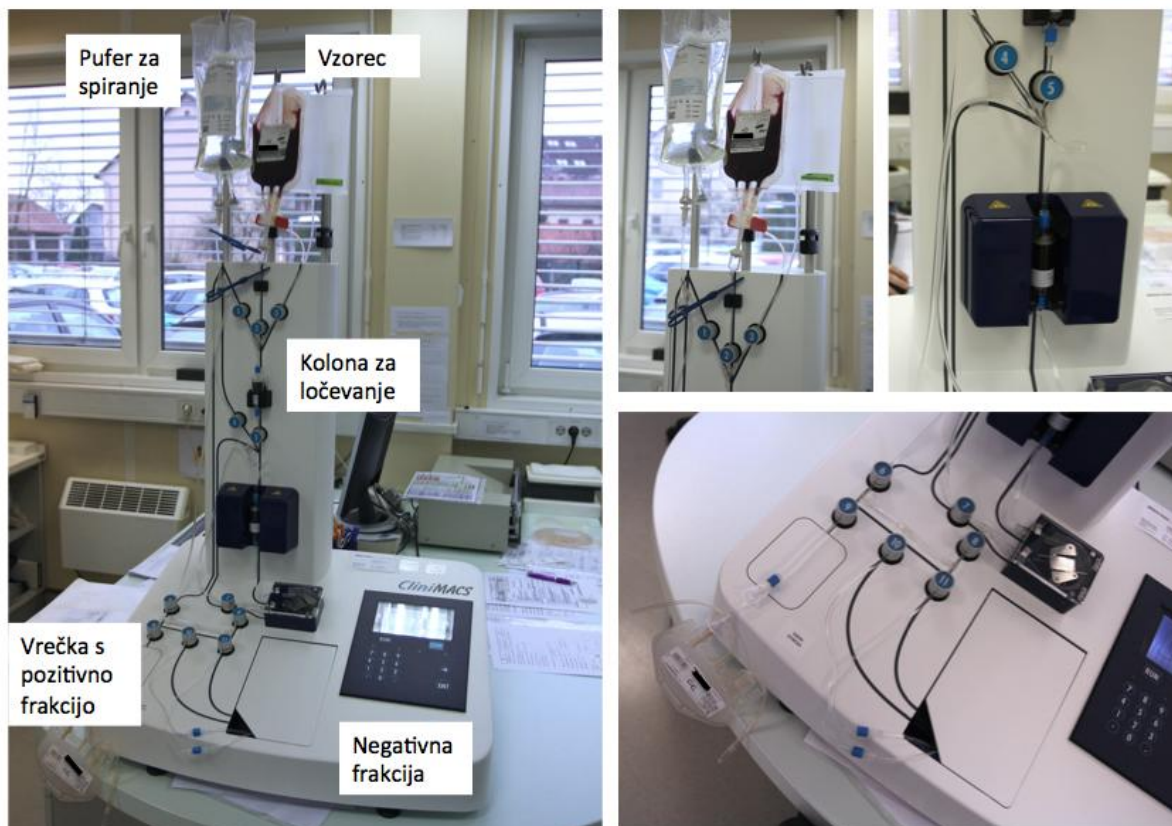
Detekcija fluorescence seveda ni omejena samo na vezavo protiteles, ki so konjugirana s fluorokromi. Lahko uporabimo katerikoli izvor fluorescence, npr. znotrajcelična barvila (»Hoechst«, propidijev iodid, 7-amino-aktinomycin D) uporabljamo za detekcijo DNA ali RNA.

## PRIMER: Zdravljenje s krvotvornimi matičnimi CD34+ celicami, koncentriranimi z imunomagnetno selekcijo

Izolacija obogatene populacije krvotvornih matičnih celic običajno poteka s pozitivno imunomagnetno selekcijo na celični označevalec CD34. Za klinične namene se uporablja zaprt avtomatiziran sistem za ločevanje celic. Pomembna podataka pri takšnem načinu priprave celic za bolnika sta **čistost** suspenzije celic, ki jo bodo uporabili za presaditev, ter **izkoristek** čiščenja.

$$\text{čistost} = \frac{\text{Št. CD34 + celic v pozitivni frakciji}}{\text{Št. vseh levkocitov v pozitivni frakciji}}$$

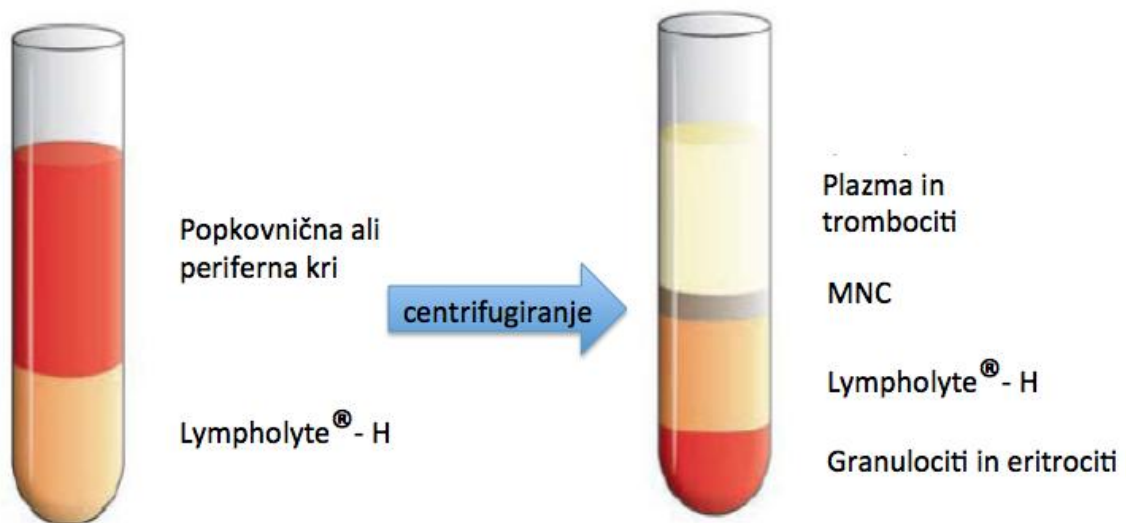
$$\text{izkoristek} = \frac{\text{Št. CD34 + celic v pozitivni frakciji}}{\text{Št. CD34 + celic v levkocitnem pripravku}}$$



Slika 17: Naprava za imunomagnetno ločevanje celic na Zavodu republike Slovenije za transfuzijsko medicino omogoča aseptično ločevanje celic namenjenih za presaditev od ostalih celic v suspenziji.

## Gradientno centrifugiranje

Enojdne celice (MNC, ang. Mono Nuclear Cell) lahko iz krvi izoliramo z gradientnim centrifugiranjem z uporabo različnih komercialnih pripravkov, eden izmed njih je Lympholyte®-H. To je vodna raztopina z gostoto 1.077 g/ml na osnovi fikola, ki je sintetični polimer saharoze in epiklorohidrina, z relativno molekulsko maso 400000. Postopek gradientnega centrifugiranja temelji na razliki v gostoti MNC in drugih sestavin v krvi, zaradi česar se ločijo v različne plasti. Vzorec periferne ali popkovnične krvi (tudi kostnega mozga) previdno nanese nad plast fikola tako, da se plasti ne premešata, in centrifugiramo. Pri tem celice potujejo proti meji med krvjo in sredstvom Lympholyte®-H, kjer pridejo v stik s fikolom. Ta pri sobni temperaturi povzroči agregacijo eritrocitov in s tem hitrejšo sedimentacijo na dno centrifugirke. V plasti neposredno nad eritrociti se nahajajo večinoma granulociti, katerim se ob stiku z rahlo hipertoničnim sredstvom Lympholyte®-H poveča gostota in s tem tudi hitrost sedimentacije. Limfociti in monociti se zaradi svoje majhne gostote ne morejo prebiti skozi Lympholyte®-H. Skupaj s trombociti tvorijo zgoščeno plast na meji med plazmo in sredstvom Lympholyte®-H. S spiranjem se nato znebimo preostanka plazme, gradientnega medija in trombocitov.



**Slika 18: Izolacija MNC z gradientnim centrifugiranjem.** S tem postopkom se celične populacije med centrifugiranjem zbirajo v ločenih plasteh.

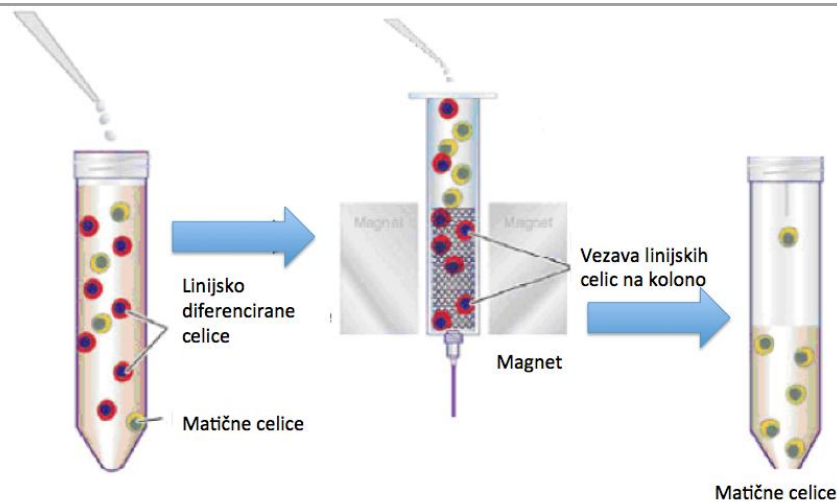
## EKSPERIMENTALNO DELO

### Postopek ločevanja celic iz krvi z gradientnim centrifugiranjem

- Vzorec krvi najprej razredči v razmerju 1:1 z D-PBS pufrom brez  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$ , ter segrej na sobno temperaturo.
- Sredstvo Lympholyte®-H segrej na sobno temperaturo in ga dobro premešaj. Počakaj, da izginejo mehurčki in 15 ml prenesi v 50 ml centrifugirko.
- Nanj previdno nanesi 30 ml razredčene krvi. Pri tem pazi, da se plasti med seboj ne premešata.
- Vzorce nato 15 minut centrifugiraj na sobni temperaturi pri  $950 \times g$  z minimalnim pospeševanjem in brez zaviranja.
- S Pasteurjevo pipeto odstrani plast MNC in jih prenesi v novo 50 ml centrifugirko. Dodaj puffer D-PBS do oznake 50 ml in centrifugiraj 10 minut pri  $500 \times g$  na sobni temperaturi.
- Odstrani supernatant in celice resuspendiraj v 0,4 ml pufra za spiranje (2 mM EDTA in 0,5 % BSA v pufu D-PBS).

### **Ločitev matičnih celic od linijsko diferenciranih celic z negativno selekcijo**

Enojdrne celice po gradientnem centrifugiranju vsebujejo mešanico različnih linijsko usmerjenih celičnih vrst (limfocite, monocite, itd.) ter zelo majhen odstotek matičnih celic (mezenhimske matične celice, krvotvorne matične celice). Kit *Human Lineage Cell Depletion Kit* vsebuje monoklonska protitelesa proti desetim linijsko specifičnim označevalcem na celicah (CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123, glikoforin A – glej preglednico 5), ki se vežejo na linijsko diferencirane celice in so označena z biotinom. Na primarna protitelesa se vežejo sekundarna protitelesa proti biotinu z vezanim magnetnim nanodelcem. Ko mešanico tako označenih (linijsko diferenciranih, oziroma LIN-pozitivnih celic) ter neoznačenih (linijsko neusmerjenih, oziroma LIN-negativnih) celic spustimo skozi kolono z magnetnim poljem, dobimo dve ločeni frakciji celic. Večina celic se nahaja znotraj LIN-pozitivne frakcije, LIN-negativna frakcija pa vsebuje majhno število matičnih celic – matične celice v frakciji niso označene s protitelesi in so zato uporabne za nadaljnje analize.



**Slika 19:** Shematski prikaz ločevanja matičnih celic z uporabo kolon v magnetnem polju. Magnetno polje pritegne linijsko diferencirane celice, ki so označene s protitelesi. Matične celice potujejo skozi kolono in se zbirajo v centrifugirki.

## EKSPERIMENTALNO DELO

### Postopek ločevanja celic z imunomagnetno negativno selekcijo

**Preglednica 5:** Označevalci CD na celicah, ki jih zaznava *Human Lineage Cell Depletion Kit*

Označevalec CD	Celice, ki ga izražajo
CD2	timociti, T-limfociti, NK-celice
CD3	timociti, T-limfociti
CD11b	monociti, makrofagi, mikroglia, delno granulociti, NK celice in dendritične celice
CD14	monociti, makrofagi, nevtrofilci
CD15	nevtrofilci
CD16	NK-celice, makrofagi, mastociti, nautrofilci
CD19	B-limfociti, flokularne dendritične celice
CD56	NK-celice, T-limfociti, najdeni tudi v mišicah
CD123	plazmacitoidne dendritične celice in bazofilci, delno na monocitih, eozinofilnih granulocitih in mieloidnih dendritičnih celicah.
CD235a (Gly-A)	eritrociti

- Pripravi si 400  $\mu\text{L}$  celične suspenzije v pufru za spiranje (2 mM EDTA in 0,5 % BSA v pufru D-PBS), v kateri skupno število celic ne bo preseglo  $10^8$ .
- Dodaj 100  $\mu\text{L}$  z biotinom označenih primarnih protiteles.
- Dobro premešaj in inkubiraj 10 minut v hladilniku.
- Dodaj 5 mL pufru in centrifugiraj 10 minut pri  $500 \times g$  na sobni temperaturi.
- Popolnoma odstrani supernatant in celice resuspendiraj v 800  $\mu\text{L}$  pufru.
- Dodaj 200  $\mu\text{L}$  magnetnih delcev s protitelesi, specifičnimi proti biotinu.

- Dobro premešaj in inkubiraj 15 minut v hladilniku.
- Dodaj 5 ml pufra in centrifugiraj 10 minut pri  $500 \times g$ .
- Med centrifugiranjem vstavi kolono LD v magnetni nosilec, podnjo podstavi 15-ml centrifugirko in jo speri z 1 mL pufra. Pri nanašanju pufra v kolono pazi, da se ne tvorijo mehurčki.
- Popolnoma odstrani supernatant in celice resuspendiraj v 500  $\mu$ l pufra, tako da nastane čim manj mehurčkov.
- Celice nanesi na kolono in počakaj, da suspenzija s celicami steče skozi kolono. Kolono speri 3 x z 1 mL pufra. Pred nanosom svežega pufra vedno počakaj, da je rezervoar v koloni prazen.
- Odstrani kolono iz magnetnega nosilca in jo postavi nad svežo 15-ml centrifugirko. Dodaj 3 ml pufra in z batom čvrsto iztisni pozitivno frakcijo celic iz kolone.
- Centrifugiraj 10 minut pri  $500 \times g$ .
- Odstrani supernatant in celice resuspendiraj v 100  $\mu$ l pufra.
- Zmešaj 10  $\mu$ l celične suspenzije z 10  $\mu$ l tripsanskega modrila in preštej celice na števeni komori za enkratno uporabo.

***Izpolni preglednico:***

<i>vzorec</i>	<i>število celic</i>	<i>delež celic glede na izhodiščno populacijo</i>
MNC		
LIN-		
LIN+		

## Postopek ločevanja celic z imunomagnetno pozitivno selekcijo

### OSAMITEV MONOCITOV CD14+ NA KOLONI LS-HITRA DEPLECIJA

- Za ločevanje uporabi  $100 \times 10^6$  PBMNC.
- Celice centrifugiraj pri 300g, 10 min.
- Supernatant previdno odpipetiraj in celice ustrezno resuspendiraj v 100  $\mu$ L pufra (v nadaljevanju p: 0,5% FBS v DPBS).
- Inkubiraj 20 min v hladilniku.
- Dodaj protitelesa vezana na kroglice (Miltenyi CD14 MicroBeads) human, inkubiraj 15 min v hladilniku.
- Dodaj 20 mL DPBS (**hladni!**) in centrifugiraj pri 400g, 7 min, 5,5, ST

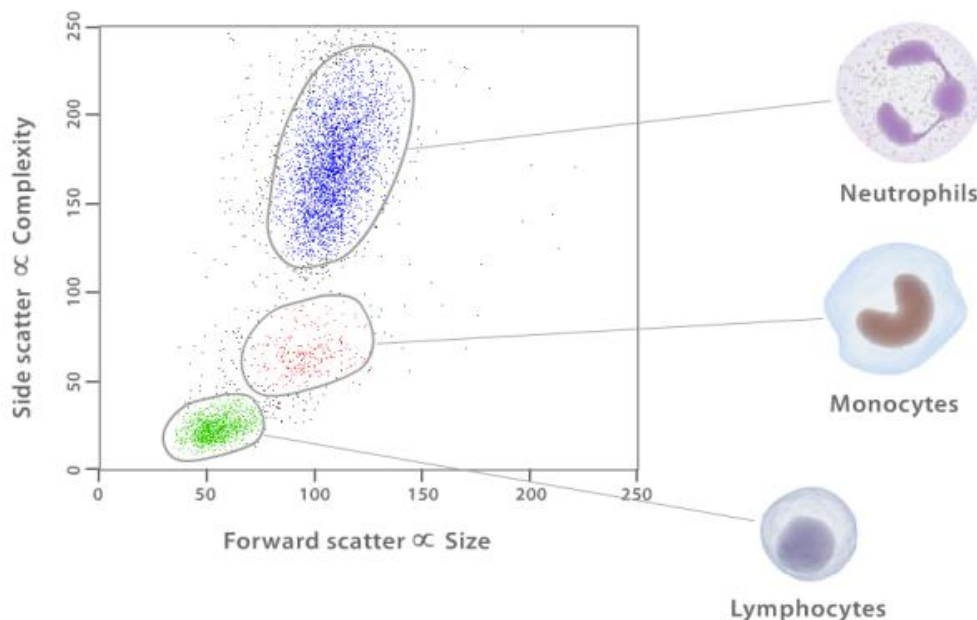


- Supernatant zavrži in celice resuspendiraj v 950  $\mu$ L pufra.
- Kolono vstavi v magnet.
- Suspenzijo celic prenesi na kolono s pipeto.
- Kolono sperj z 1 mL pufra, in nato še z 2x s 5 mL.
- Odstavi magnet in vezane CD14+ sperj s 3 mL pufra v 50 mL centrifugirko.
- S pufrom dopolni do 5 mL in celice preštej.

**OPOMBA:** pufer (0,5% FBS v DPBS) mora biti ves čas na hladnem, prav tako 20 mL DPBS, ki ga dodamo po vezavi protiteles.

## Fluorescenčna mikroskopija in pretočna citometrija

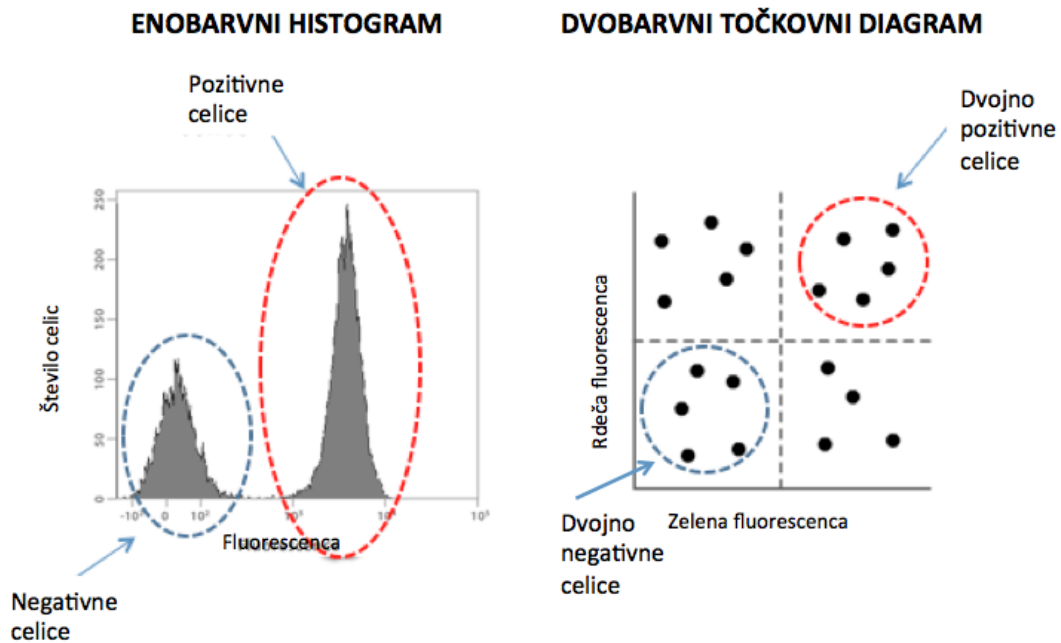
**Pretočni citometer** (tudi FACS – ang. Fluorescence Activated Cell Sorter) je naprava, ki je postala nepogrešljiva v raziskovalnih in diagnostičnih laboratorijih. Za analizo s pretočnim citometrom potrebujemo posamezne celice v suspenziji, ki v curku potujejo v optični sistem. Laserski žarek v pretočnem citometru, ki zadene celico oziroma strukturo, pobarvano s fluorokromom, se na njej odbija, lomi ali absorbira v fluorokromih. Svetlobo, ki jo celica po osvetlitvi oddaja, zaznajo fotosprejemniki in elektronika aparature spremeni svetlobne impulze v električne. Pretočni citometer ima tudi računalnik, ki zbere, analizira in usklajuje podatke ter uravnava delovanje aparata. Svetloba, ki se odbija in lomi na celici nam daje podatek o velikosti (FSC – ang. Forward Scatter) in zrnatosti (SSC - ang. Side Scatter) celice.



**Slika 20:** Razporeditev krvnih celic glede na njihovo velikost (FSC) in zrnatost (SSC).

Fluorokromi, s katerimi so najpogosteje označena monoklonska protitelesa, po osvetlitvi z lasersko svetlobo oddajajo specifično svetlobo večjih valovnih dolžin, ki jo zaznavajo posebni fotosprejemniki. Celico lahko hkrati obarvamo z več različnimi fluorokromi, pri tem pa

moramo izbrati takšne kombinacije fluorokromov, ki oddajajo svetlobo različnih valovnih dolžin, da jih med seboj lahko ločimo.



**Slika 21: Prikaz rezultatov meritve s pretočnim citometrom na histogramu ali na točkovnem diagramu.** Na histogramu je desno prikazana populacija celic označena s fluorokromom, levo pa je populacija celic, na katero se fluorokrom ni vezal. Na točkovnem diagramu so celice razporejene v kvadrante glede na obarvanost z dvema fluorokromoma.

## EKSPERIMENTALNO DELO

### Postopek identifikacije krvotvornih matičnih celic po imunomagnetni depleciji

- Odpipetiraj 100  $\mu\text{L}$  celične suspenzije LIN-negativne frakcije ( $10^5$  celic) v 5 mL epruveto za pretočni citometer.
- Dodaj 10  $\mu\text{L}$  s FITC označenih protiteles anti-CD45 in z fikoeritriinom označenih protiteles anti-CD34. Premešaj in inkubiraj 15 min na sobni temperaturi v temi.
- Dodaj 400  $\mu\text{L}$  PBS in s pretočnim citometrom določi populacijo KMC.

#### **koncentracija KMC**

#### **celokupno število KMC v pripravku**

#### **%KMC glede na levkocite**

## 9 Vaja 3: Postopki določanja števila in živosti celic

### 1. NEKROZA

Nekroza je patološka celična smrt, ki nastopi zaradi ekstremnih sprememb v okolju. Ker ob tem pride do poškodbe celične membrane, lahko v notranjost poleg vode in ionov vdrejo tudi barvila, na podlagi katerih mrtve celice ločimo od živih. Za razliko od apoptoze (glej dalje) poteka hkrati v več celicah oziroma v delu tkiva. Ob nekrozi celica, jedro in mitohondriji nabreknejo, razgradijo se membrane in vsebina celice se izlije med sosednje celice. Takšen proces zaznamo kot vnetje.

Barvanje citoplazme mrtvih celic s tripanskim modrilom je bil eden prvih načinov določanja živosti ali viabilnosti celic v laboratoriju. Za ločevanje živih od mrtvih celic se uporabljajo tudi flurokromi, kot so propidijev jodid (PI) in 7-amino-aktinomicin D (7-AAD), ki se po vstopu v nekrotične ali pozno apoptotične celice vežejo na nukleinske kisline. V rutinski uporabi se najpogosteje uporablja fluorokrom 7-AAD.

Pri delu s celicami, še posebno pri celicah, ki so namenjene za zdravljenje, moramo vedno preverjati njihovo viabilnost. Od tega je namreč odvisno število celic, ki bodo imele želeni biološki učinek pri bolniku.

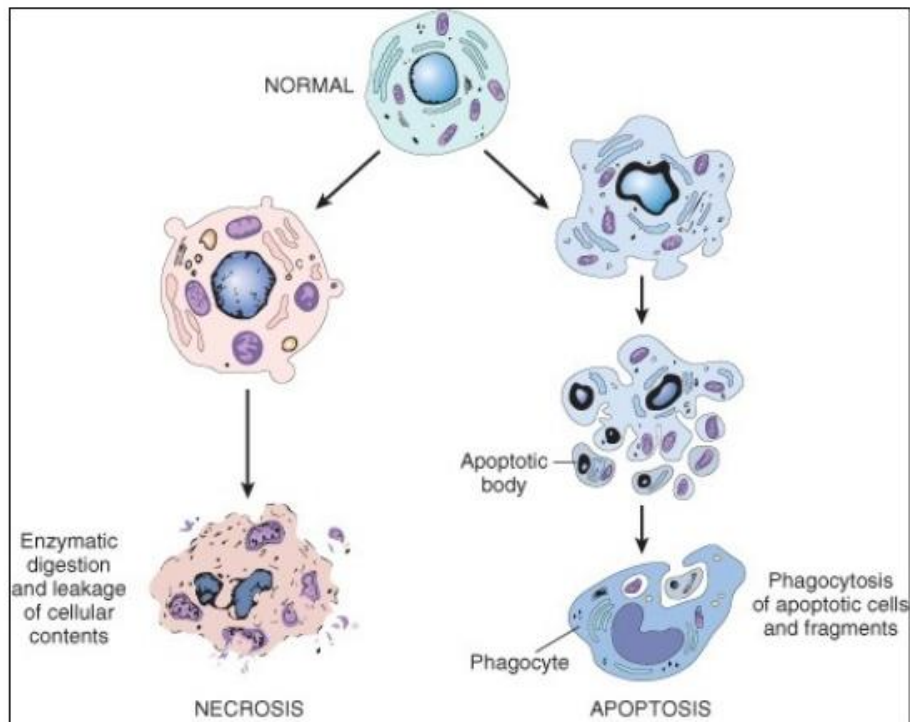
Poleg mrtvih celic običajno določamo tudi delež zgodnje apoptotičnih celic, ki jih z zgoraj opisanimi postopki za določanje mrtvih celic ne moremo ločiti od živih.

### 2. APOPTOZA

Apoptoza je natančno uravnavan proces celične smrti, do katerega prihaja med razvojem in delovanjem organizma. V nasprotju z nekrozo oziroma patološko celično smrtjo, apoptoza ne izzove vnetnega procesa. Kaskada biokemičnih reakcij privede do morfoloških sprememb celice, vidnih tudi pod mikroskopom. Celica se skrči, na površini se pojavijo mehurčasti izrastki, jedro in mitohondriji se razgradijo, DNA pa se razreže na krajše fragmente. V končni stopnji apoptotične celice ali apoptotična telesca, ki nastanejo iz njih, požrejo imunske celice v procesu fagocitoze.

Za normalno delovanje organizma je apoptoza nujno potrebna, saj se s tem odstranjujejo celice, ki imajo poškodovano DNA, so rakasto spremenjene ali so odvečne (npr. pri razvoju organov pri zarodku).

Apoptozo sproži pomanjkanje ali prisotnost določenih ravnih dejavnikov, pa tudi dejavniki iz okolja, ki poškodujejo DNA, kot so prosti radikali, različni virusi, obsevanje. Apoptozo celic *ex vivo* lahko sproži sprememba temperature, prisotnost ali odsotnost določenih snovi v gojiščih za celice ali zamrzovalnih raztopinah.



**Slika 22: Nekroza in apoptoza.** Prikazane so ključne stopnje v procesu nekroze in apoptoze.

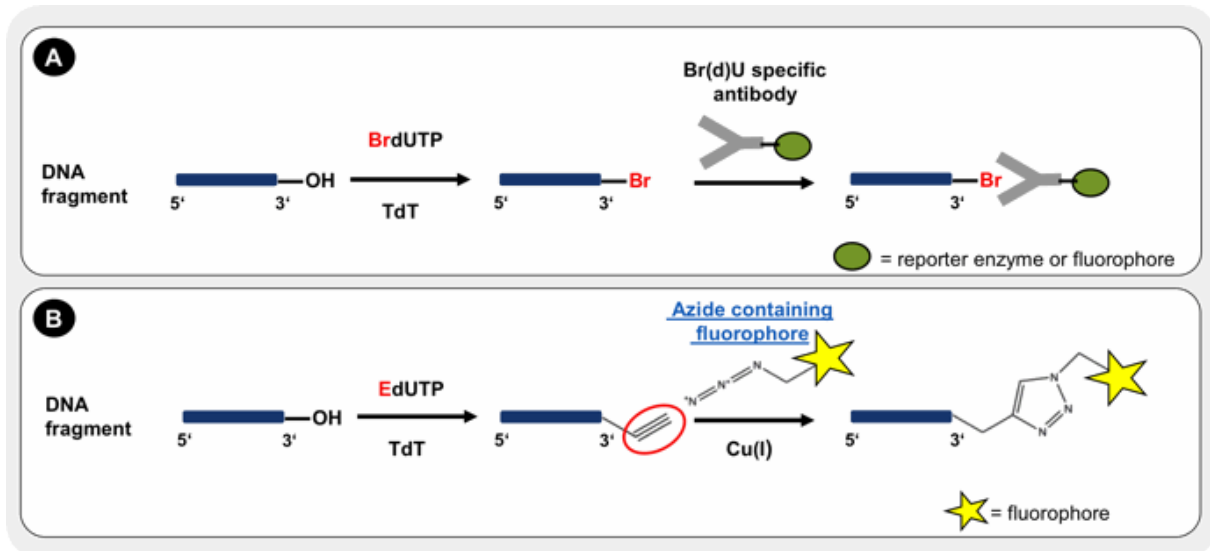
<http://ormigita-k.blogspot.com/>

Dobra plat testov viabilnosti je ta, da so hitri, v večini primerov je dovolj že do 10 minutna izpostavljenost barvilu. Slaba plat pa je ta, da se nam celice v zgodnjih fazah apoptoze največkrat izmuznejo, ker barvil še ne prepuščajo. Zato apoptozo določamo na podlagi drugih celičnih sprememb, kot je na primer porušenje membranske asimetrije. Molekule fosfatidilserina, ki se nahajajo v citosolnem delu celične membrane se na začetku apoptoze začnejo premeščati v zunajcelično plast celične membrane, kjer služijo kot signal za prepoznavanje in odstranitev z makrofagi. Aneksini se v prisotnosti kalcijevih ionov lahko vežejo na izpostavljeni fosfatidilserin, zato apoptotične celice obarvane s fluorescenčno označenim aneksinom ločimo od mrtvih. Spremembam, ki se dogajajo med apoptozo, sledimo tudi s testom DNA fragmentacije, merjenjem aktivnosti kaspaz, merjenjem membranskega potenciala mitohondrijev, sproščanjem citokroma C in drugimi. Katero vrsto testa izberemo, je odvisno od vrste celic, za krvotvorne matične celice pa se najpogosteje uporablja označevanje z aneksinom V.

### **Postopek TUNEL (*terminal deoxynucleotidiltransferase dUTP nick labeling*)**

S postopkom označevanja fragmentirane DNA določamo celice, ki so v pozni apoptozi. V poznejši fazi apoptoze se namreč aktivirajo encimi endonukleaze, ki razrežejo DNA na

manjše fragmente, dolge od 50-300 baznih parov. Fragmenti imajo izpostavljene 3'OH proste konce. Encim terminalna deoksinukleotidil transferaza dodaja označene nukleotide (Br-dUTP) na 3'OH proste konce DNA fragmentov. Po dodatku s fluorokromom označenih protiteles, ki se vežejo na polinukleotidni rep, s pretočnim citometrom določamo fragmentirano DNA.



Slika 23: Označevanje DNA fragmentov z BrdU ali z EdU.

## EKSPERIMENTALNO DELO

### Štetje celic z uporabo hemocitometra

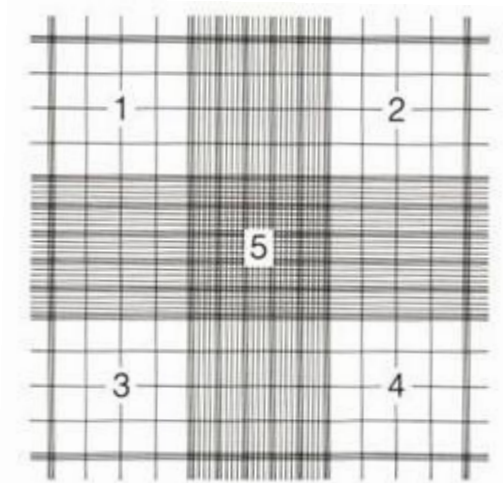
V epici pripravi vzorec za določanje števila viabilnih/mrtvih celic:

- 10  $\mu\text{L}$  celične suspenzije zmešaj z 10  $\mu\text{L}$  tripsanskega modrila.
- 10  $\mu\text{L}$  tako pripravljene celične suspenzije nanesi na hemocitometer.
- Na hemocitometru preštej celice na štirih kvadratih (na Sliki 24 označeni s številkami) površine 1  $\text{mm}^2$  in število celic izračunaj po formuli:

$$c = \frac{\text{št. celic}}{\text{št. prešteti kvadrati sestavljeni iz mreže } 4 \times 4} \times \text{redčitev} \times 10^4 \left[ \frac{\text{celic}}{\text{mL}} \right]$$

Faktor  $10^4$  za izračun števila celic v 1 mL suspenzije; globina komore hemocitometra je 0,1 mm, površina vsakega kvadratka je 1  $\text{mm}^2$ , torej je volumen suspenzije 0,1  $\mu\text{L}$  in faktor =  $10^4$ .

- Izračunaj skupno število celic v celotni prostornini celične suspenzije.



**Slika 24: Mreža hemocitometra za štetje celic.**

## **Tripansko modrilo**

Integriteta membrane mrtve celice se poruši, zato barvilo lahko prodre v notranjost celice in celica se obarva modro. Tripansko modrilo je toksično, zato mu celice ne smejo biti predolgo izpostavljene (največ 3-5 minut), saj pride v nasprotnem primeru do uničenja živih celic, kar povzroči prevzem barvila tudi v te celice.

## **Štetje celic z uporabo avtomatskega števca »Vicell«**

Prikaz avtomatskega štetja celic in merjenja viabilnosti po barvanju celic s tripanskim modrilom. Avtomatski števec celice prešteje na 50 vidnih poljih, zato je dobljeno število celic natančnejše kot z uporabo svetlobnega mikroskopa.

## **Štetje celic s pretočnim citometrom: Določanje števila krvotvornih matičnih CD34+ celic z uporabo fluorescentnih kroglic za štetje**

»Trucount« (Becton Dickinson) epruvete vsebujejo liofiliziran skupek mikrokroglic, ki se raztopi ob dodatku vzorca. V vsaki epruveti je znano število fluorescentnih kroglic. Na ta način lahko zelo natančno določimo absolutno število celic v vzorcu in pri tem ne potrebujemo dodatne naprave za štetje celic. Pretočni citometri nekaterih proizvajalcev omogočajo določanje absolutnega števila celic brez uporabe fluorescentnih kroglic ali drugih dodatkov. Ti pretočni citometri izmerijo volumen vzorca, v katerem nato analizirajo število in fenotip celic. Tako lahko izračunamo koncentracijo in celokupno število celic v vzorcu.

Večina laboratorijev za določitev natančnega števila krvotvornih matičnih celic uporablja fluorescentne kroglice za štetje, pri čemer preiskovanemu vzorcu kostnega mozga, periferne

ali popkovnične krvi dodamo znano število kroglic za štetje. Iz razmerja med preštetim številom fluorescentnih kroglic in preštetim številom celic, ki so pozitivne na označevalca CD34 in CD45 nato izračunamo absolutno število krvotvornih matičnih celic. CD34 je označevalec KMPC, CD45 pa izražajo levkociti (slika 25).

### Postopek štetja celic s pretočnim citometrom

- Označi »Trucount« epruveto za pretočni citometer.
- Vanjo odpipetiraj 50 µL dobro premešane krvi tako, da se ne dotikaš kovinske mrežice na dnu. V primeru, da koncentracija levkocitov v krvi presega  $50 \times 10^9/L$ , vzorec predhodno ustrezno redči s PBS.
- Dodaj 10 µL anti-CD34 PE in 10 µL anti-CD45 FITC protiteles in premešaj.
- Vzorec inkubiraj 20 min na sobni temperaturi v temi.
- Dodaj 500 µL pufra za lizo eritrocitov in premešaj.
- Inkubiraj 10 min na sobni temperaturi v temi.
- Premešaj in analiziraj vzorec s pretočnim citometrom.
- Izračunaj koncentracijo CD34+ celic ter njihovo celokupno število v enoti krvi, če veš, da je izhodiščni volumen krvi 27 mL. Izpolni tabelo.

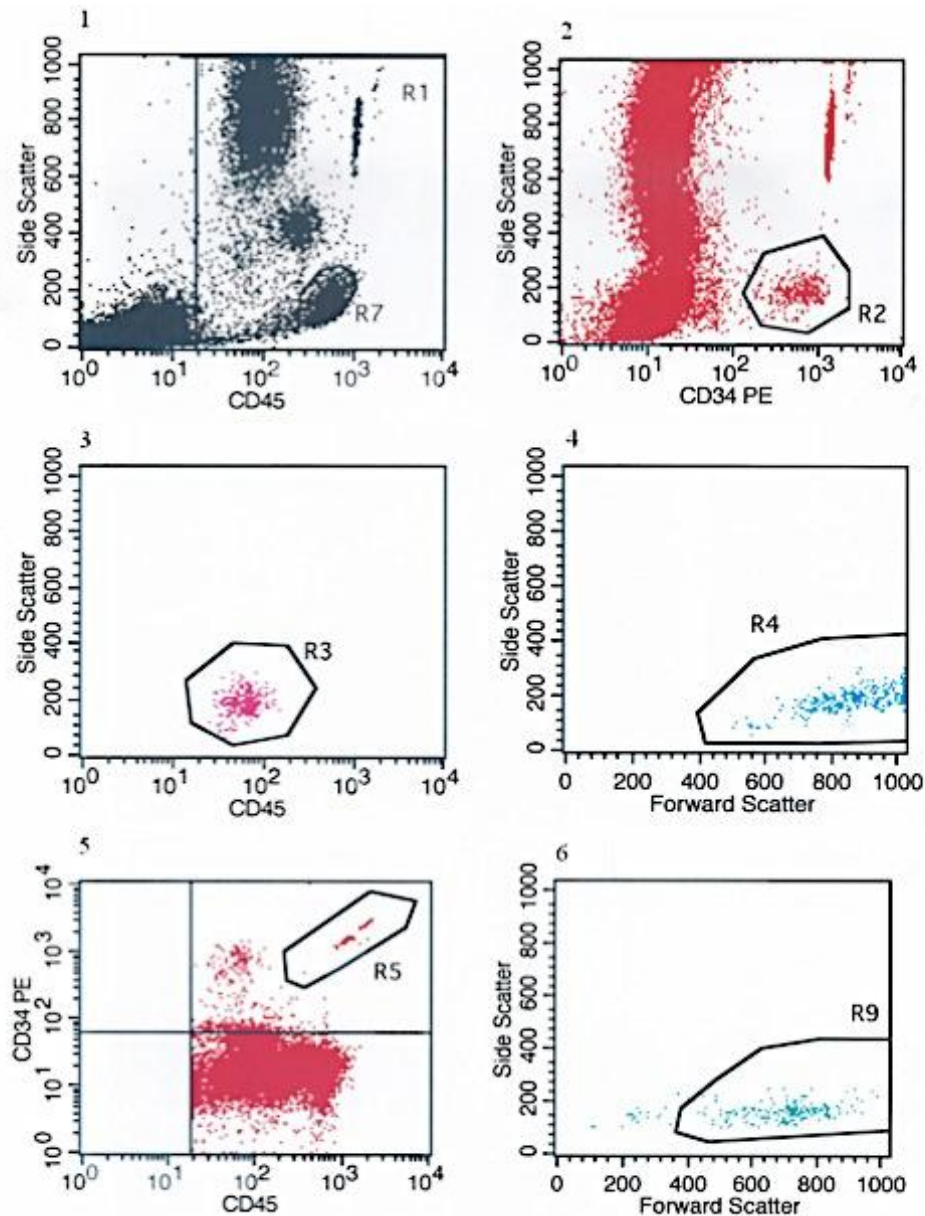
Analiza KMC s pretočnim citometrom je večstopenjska, pomagaj si s primerom analize, ki je prikazan na sliki 25.

### **Izračun koncentracije matičnih celic**

$$\frac{\text{št. preštetih CD34+celic (events)} \times \text{št. kroglic v epruveti} \times \text{redčitev}}{\text{št. preštetih kroglic (events)} \times V \text{ vzorca } (\mu\text{L})} = \text{št. CD34 + celic}/\mu\text{L}$$

### ***Izpolni preglednico:***

koncentracija KMC celic	
celokupno število KMC v pripravku	
odstotek KMC glede na levkocite	
odstotek mrtvih KMC	



**Slika 25: Primer analize populacije CD34 + celic na pretočnem citometru.**

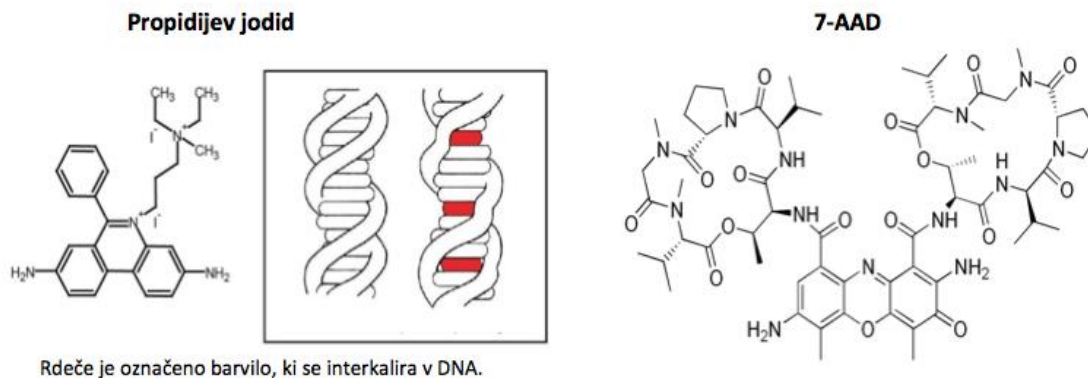
Graf 1 prikazuje CD45+ celice v področju R1 in limfocite v področju R7. V drugem koraku iz CD45+ celic izločimo CD34+ celice (graf 2, področje R2). Nato izmed celic s šibkim izražanjem CD45, izberemo CD34+ celice, ki imajo nizko SSC (graf 3). V grafu 4 so prikazane celice CD34+ z uporabo SSC in FSC na področju limfocitov in nedozorelih celic (področje R4). V grafu 5 je določena spodnja meja vrednosti CD45+ glede na celice CD34+, celice CD34-, CD45- so na ta način izključene. Ta graf prikazuje tudi močno fluorescenčne kroglice za štetje, ki so zbrane v področju R5. Graf 6 prikazuje limfocite v področju R9.



## Določanje števila mrtvih/apoptotičnih celic s pretočno citometrijo

### Barvili propidijev jodid (PI) in 7-amino-aktino-micin (7-AAD)

Barvili omogočata določanje deleža mrtvih celic, saj se vgradita v nukleinske kisline mrtvih celic.

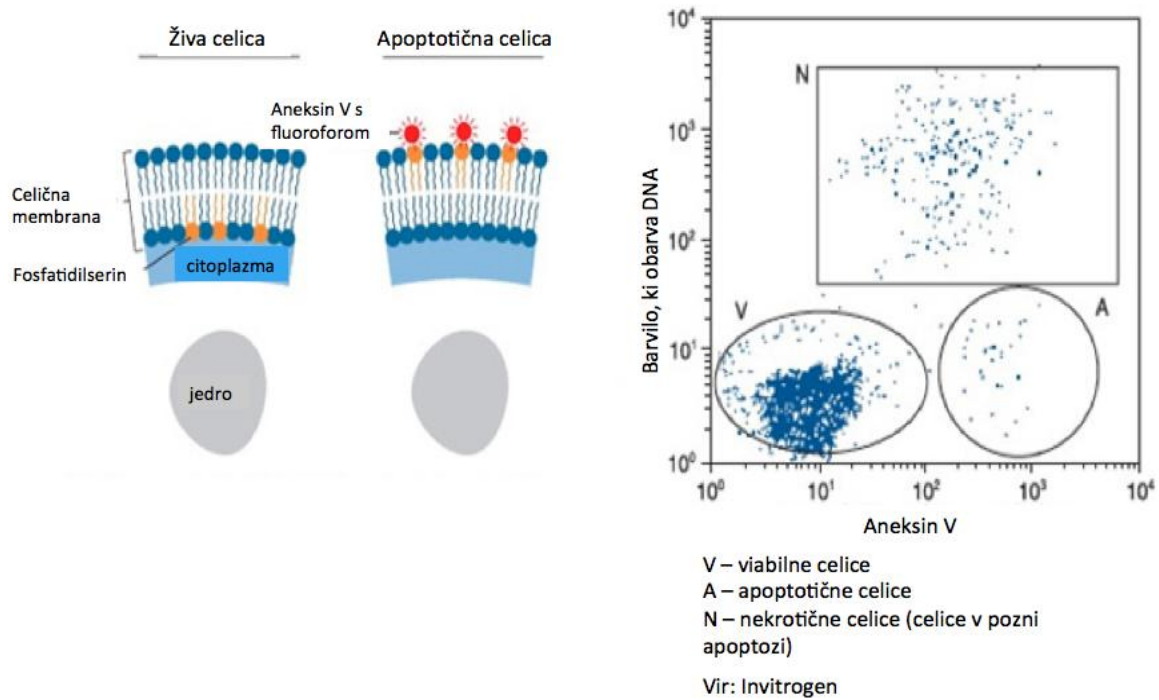


**Slika 26:** Barvili propidijev jodid in 7-AAD se uporabljata za določanje viabilnosti celic.

Barvilo 7-AAD oddaja fluorescenco nižje jakosti kot propidijev jodid. Barvilo 7-AAD vzbujamo pri 488 nm, fluorescenco pa oddaja pri 650 nm. Zato se ne prekriva s spektrom barvil PE in FITC in je primernejši kot propidijev jodid za določanje viabilnosti v ekperimentih kjer uporabljamo tudi ti dve barvili.

### Barvilo aneksin V

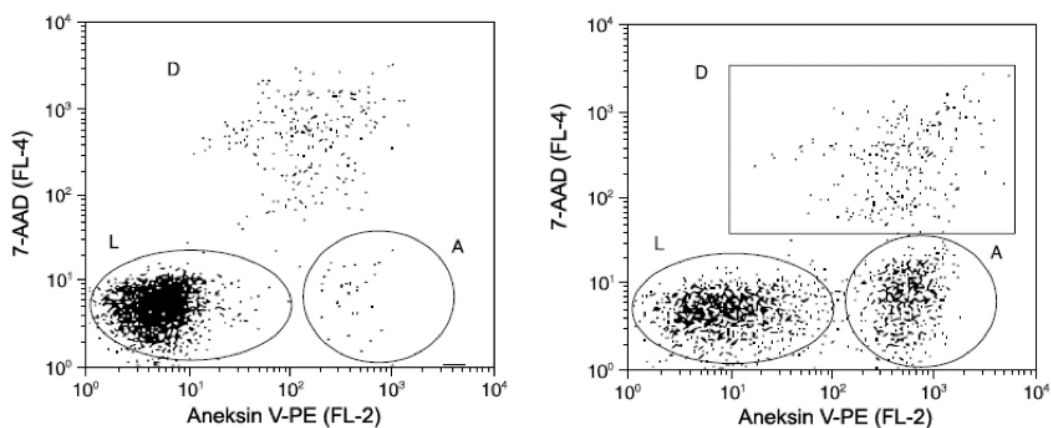
Aneksin V je protein z visoko afiniteto za fosfatidilserin. V normalnih celicah se fosfatidilserin nahaja v notranji plasti celične membrane. Pri apoptozi pa pride do premestitve na zunanjo plast oziroma na površino celice. Z vezavo aneksina V, označenega s fluorokromom ali biotinom, lahko zaznamo apoptotične celice (slika 27).



**Slika 27: Določanje apoptotičnih celic z barvilom Aneksin V.**

Zgodnjo apoptozo prepoznamo po vezavi aneksina V na zunanji sloj celične membrane. V kasnejših stadijih apoptoze postane celična membrana luknjasta ter barvila, ki barvajo DNA, lahko prehajajo skozi in obarvajo DNA – to je še dodaten označevalec apoptoze.

Apoptotične celice od nekrotičnih ločimo s sočasno uporabo barvila npr. PI ali 7-AAD, ki se veže na DNA, in aneksina V. Aneksin V namreč prodre tudi v nekrotične celice, ker imajo le-te poškodovano celično membrano, in se veže na fosfatidilserin na notranji strani membrane. PI pa prodre v nekrotične, v apoptotične pa ne.



**Slika 28: Vzorec celic s sproženo apoptozo (desno) in kontrolne celice (levo). A – zgodnje apoptotične celice (aneksin<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>); L – žive celice (aneksin<sup>-</sup>/7-AAD<sup>-</sup>); D – mrtve celice (aneksin<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>). Pri vzorcu celic, ki so bile izpostavljene toksični kemikaliji (desno), opazimo večji odstotek zgodnje apoptotičnih celic.**

## EKSPERIMENTALNO DELO

### Postopek določanja apoptotičnih celic

- Pripravi 1x aneksin V vezavni pufer tako, da 10 x vezavni pufer redčiš z destilirano vodo.
- V epruveto za pretočni citometer odpipetiraj 50  $\mu\text{L}$  (cca.  $10^5$  celic) dobro premešanega vzorca celic.
- Celice sperj s PBS – centrifugiraj pri 500 x g 5 minut in odlij supernatant.
- Celice resuspendiraj v 100  $\mu\text{L}$  aneksin V vezavnega pufera.
- Dodaj 10  $\mu\text{L}$  barvila aneksin-V-FITC in 10  $\mu\text{L}$  barvila 7-AAD in premešaj. Vzorec inkubiraj 20 min na sobni T v temi.
- Dodaj 400  $\mu\text{L}$  aneksin V vezavnega pufera in analiziraj s pretočnim citometrom.
- Določi odstotek apoptotičnih in odstotek nekrotičnih celic.

### PONAVLJANJE

1. Opišite postopke, s katerimi se znebimo eritrocitov iz vzorca krvi.
  
2. Zakaj je pomembno, da sta tako popkovnična/periferna kri kot Lympholyte®-H segreta na sobno temperaturo?

pripravek	količina pripravka mL	levkociti $\times 10^9/\text{L}$	% CD34+	celokupno št. CD34+	% viabilnosti
levkocitni pripravek po aferezi (LP)	147.0	221.2	0.83	$268.3 \times 10^6$	97.9
pozitivna frakcija po ločevanju (CC)	43.2	4.6	92.5	$183.8 \times 10^6$	99.2

3. V preglednici so rezultati analize krvotvornih matičnih celic iz periferne krvi bolnika po stimulaciji z G-CSF, pred in po postopku pozitivne imunomagnetne selekcije CD34+ celic.

Iz podatkov izračunaj izkoristek in čistost suspenzije CD34+ celic.

$$\text{izkoristek} = \frac{\text{Št. CD34 + celic v pozitivni frakciji}}{\text{Št. CD34 + celic v levkocitnem pripravku}}$$

$$\text{čistost} = \frac{\text{Št. CD34 + celic v pozitivni frakciji}}{\text{Št. vseh levkocitov v pozitivni frakciji}}$$

Gate	Events
R4 (CD34+)	438
R5 (fluor. beads)	2893

4. S pretočnim citometrom smo določali število krvotvornih matičnih celic (CD34+ celic) v popkovnični krvi. Za analizo smo uporabili 50  $\mu\text{L}$  vzorca ter 55188 fluorescentnih kroglic. Določi celokupno število krvotvornih matičnih celic v pripravku popkovnične krvi (27 mL), namenjenem za shranjevanje v banki popkovnične krvi.

Izračunaj koncentracijo in celokupno število krvotvornih matičnih celic in podatke vnesi v tabelo.

Analiza s pretočnim citometrom:

koncentracija KMC celic	
celokupno število KMC v pripravku	
odstotek KMC glede na levkocite	

## 10

# Vaja 4: Izolacija matičnih celic iz maščobnega tkiva

## Maščobno tkivo

Maščobno tkivo sestavljajo različne vrste celic. Maščobne celice oziroma adipociti predstavljajo le tretjino celic tkiva, ostalo so matične celice - ASC (angl. Adipose Derived Stem Cells), predhodnice adipocitov, fibroblasti, makrofagi, endotelijske celice, gladko-mišične celice žil in različne imunske celice. Osnovna naloga maščobnega tkiva je shranjevanje energije v obliki lipidov, prav tako pa tudi ščiti in toplotno izolira telo. V zadnjih letih je postalo jasno, da ima tudi endokrino vlogo. Adipociti so namreč presnovno aktivne celice, ki izločajo leptin (hormon, ki uravnava sitost), adiponektin, rezistin, interlevkin G, dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ), visfatin in omentin.

Zaradi svoje dostopnosti, obilnosti in sposobnosti samoobnavljanja predstavlja maščobno tkivo atraktiven vir matičnih celic. Maščobno tkivo pridobimo z izrezanjem ali z liposukcijo.

O obstoju matičnih celic v maščobnem tkivu so prvič poročali leta 2001. Hipotezo o obstoju multipotentnih matičnih celic v maščobnem tkivu so potrdili z uspešno adipogeno, hondrogeno, osteogeno in miogeno diferenciacijo v pogojih *in vitro* ob prisotnosti linijsko specifičnih dejavnikov.

## Matične celice iz maščobnega tkiva (ASC)

Kostni mozeg je bil dolgo glavni vir matičnih celic za terapevtske namene. Matične celice iz kostnega mozga imajo namreč širok diferenciacijski potencial, hkrati pa postopek pridobivanja matičnih celic iz kostnega mozga omogoča ohranjanje visoke stopnje viabilnosti celic. Vendar so zaradi zahtevnega postopka pridobivanja, majhnega volumna kostnega mozga in posledično majhnega števila matičnih celic, začeli iskati nove vire matičnih celic. V primerjavi z aspiracijo kostnega mozga je postopek pridobivanja maščobnega tkiva manj invaziven, število matičnih celic pa je večje zaradi večje količine pridobljenega tkiva.

Na proliferacijo in diferenciacijske sposobnosti ASC vplivajo številni dejavniki:

- vrsta in lokacija maščobnega tkiva,
- starost darovalca tkiva,
- način pridobivanja tkiva oz. vrsta posega,
- pogoji gojenja celic,
- gostota nasaditve celic.

Pri mlajših ljudeh je pomnoževanje celic boljše, diferenciacijske sposobnosti pa se s staranjem ohranijo. Pri dolgotrajnem gojenju ASC (več mesecev) so opazili spremembe v kariotipu

celic. Po presaditvi v miš so te celice tvorile tumorje. Kasneje se je izkazalo, da študija, ki so kazale na spontano transformacijo MSC v tumorske celice po dolgotrajnem gojenju, niso verodostojne – nekatere so bile umaknjene zaradi kontaminacije s tumorskimi linijami. Trenutno velja, da navkljub prisotnosti kariotipskih sprememb, ki nastanejo med gojenjem, spontana transformacija ni večji pomislek za uporabo MSC v terapiji.

## **Klinična uporaba ASC danes in v prihodnosti**

ASC za obnavljanje tkiva uporabljajo številne mehanizme. Na poškodovanem ali obolelem mestu lahko sproščajo citokine in rastne dejavnike, ki sodelujejo pri obnovi tkiva. Ti dejavniki spodbudijo druge endogene matične celice, da pridejo do poškodovanega tkiva, ter pomagajo pri njihovi diferenciaciji. Drugi mehanizem delovanja temelji na zagotavljanju antioksidantov. S tem odstranijo toksične snovi, ki so se sprostile v bližino poškodovanega tkiva in celice lahko poskrbijo za obnovo.

V regenerativni medicini bi lahko z ASC zdravili različne poškodbe mehkih tkiv, kosti, hrustanca in mišic.

## **PRIMER: Zdravljenje in regeneracija mehkih tkiv**

Za zdravljenje poškodb mehkih tkiv se uporabljata dva načina:

- presaditev zrelih adipocitov,
- vbrizganje maščobe obogatene s stromalno vaskularno frakcijo (SVF).

SVF je frakcija, ki jo dobimo takoj po izolaciji iz maščobnega tkiva in vsebuje različne celice. ASC iz SVF imajo sposobnost diferenciacije v adipocite, hkrati pa ta frakcija zaradi vsebnosti drugih vrst celic in rastnih dejavnikov tudi spodbuja angiogenezo.

Maščobno tkivo je pomembna komponenta pri rekonstruktivni plastični kirurgiji in večjih poškodbah mehkih tkiv. Pri večjih poškodbah se lahko pojavi težava pri ožiljanju presadka.

V estetski kirurgiji se ASC uporabljajo za:

- prikrievanje znakov staranja (kot polnila),
- popravilo neenakomerno razvitega obraza,
- povečanje prsi.

## PRIMER: Zdravljenje kostnih poškodb

ASC lahko *in vitro* uspešno diferenciramo v kostne celice, zato imajo potencial za zdravljenje zlomov. Zanimive so predvsem za uporabo pri večjih zlomih, kjer se kost ne zaraste sama. Prvi primer zdravljenja pri človeku so objavili leta 2004, ko so 7 letni deklici uspešno pozdravili zlom lobanjske kosti po hudi poškodbi glave. Rekonstrukcijo precej velike poškodbe so izvedli s kombinacijo avtologne spongiozne kosti (vzete iz črevnice) in ASC ter z uporabo biorazgradljivega nosilca. Po 3 mesecih je tomografija pokazala reosifikacijo poškodovanega mesta. Poseg se je izkazal kot varen in učinkovit (Lendeckel in sod., 2004).

Obetajoči rezultati uporabe ASC v kliničnih študijah potrjujejo smiselnost shranjevanja teh celic v biobankah, saj bi to omogočalo potencialno uporabo celičnih pripravkov v prihodnosti. Za shranjevanje so izolirane celice primernejše kot celo maščobno tkivo, saj so izgube pri zamrzovanju tkiva precej večje. Lahko shranjujemo celice takoj po izolaciji (SVF) ali celice kasnejših pasaž.

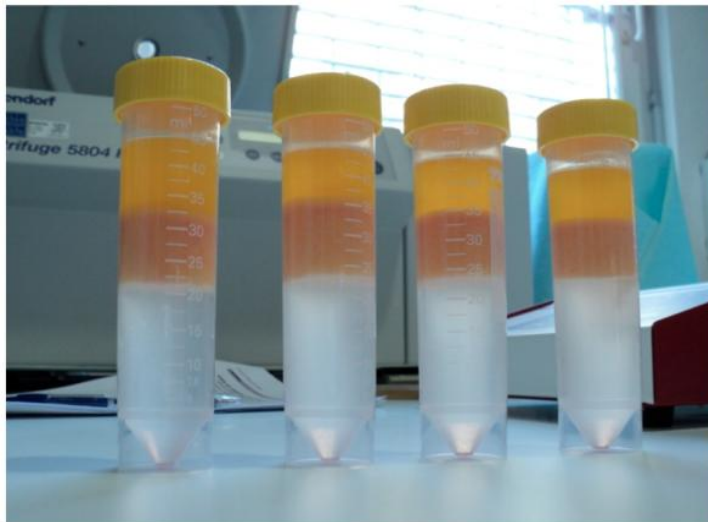
1 g sveže pridobljenega maščobnega tkiva vsebuje od  $0,8 \times 10^5$  do  $3,5 \times 10^5$  celic. Če tkivo 24 ur shranjujemo na  $4^{\circ}\text{C}$ , je uporabnih celic manj. Z liposukcijo pridobimo večje število celic kot pri izrezani maščobi.

Iz 100 mL lipoaspirata po tretji pasaži pridobimo nekje  $80 \times 10^6$  celic in po četrti  $400 \times 10^6$  celic, kar bi zadostovalo za večino potencialnih tkivno-inženirskih presadkov. To je zelo majhna količina glede na celotno količino odstranjenega tkiva pri liposukciji.

## EKSPERIMENTALNO DELO

### Postopek izolacije ASC iz maščobnega tkiva

- V 50 mL centrifugirko prenesi 20 mL maščobe.
- Dodaj 20 mL PBS.
- Centrifugiraj 7 minut na 400 x g. Po centrifugiranju dobiš 4 sloje.
- Pred vnovičnim centrifugiranjem potisni pipeto skozi maščobno plast in odstrani pelet (krvne celice) in supernatant. Pri tem pazi, da zraven ne preneseš maščobnega tkiva in maščobne tekočine.
- Spiranje ponovi 3x, da odstraniš večino krvi.
- Po zadnjem centrifugiranju smo odstranili spodnjo tekočo fazo.



**Slika 29: Vzorec po zadnjem centrifugiranju (foto: Ajda Marič).**

- V centrifugirko s spranim maščobnim tkivom dodaj cca. 20 mL raztopine kolagenaze za razgradnjo.
- Inkubiraj 40 min na 37 °C in vzorec med inkubacijo večkrat premešaj.
- Po končani inkubaciji v centrifugirki dodaj 2x volumen raztopine za deaktivacijo kolagenaze (10 % serumsko gojišče, npr. gojišče s FBS).
- Celično suspenzijo v centrifugirki nato prenesi na 100 µm celično sito.
- Celice še enkrat sperj s PBS.
- Resuspendiraj pelet, preštej celice, izmeri viabilnost in s pretočno citometrijo določi delež ASC v izolirani suspenziji.

### **Gojilni medij za ASC:**

- DMEM/F-12
- 10 % seruma
- 1 µL/mL gentamicina



**Barvanje s protitelesi za analizo celic s pretočnim citometrom**

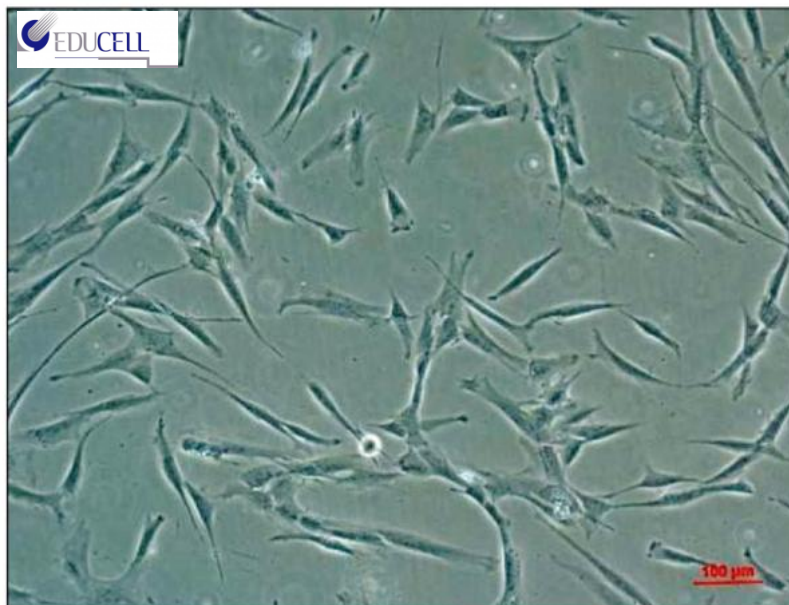
Označevalci za mezenhimske matične celice:

- CD271 (PE anti-human CD271)

Potrebujes do  $1 \times 10^6$  celic v 100  $\mu\text{L}$  PBS. Dodaj 10  $\mu\text{L}$  ustreznega protitelesa. Inkubiraj 20 min v temi na sobni T. Dodaj 2 mL PBS in centrifugiraj 5 min na 400 x g. Odstrani supernatant, pelet resuspendiraj v cca 300  $\mu\text{L}$  in analiziraj s pretočnim citometrom.

**Rezultate analize vpiši v tabelo:**

koncentracija celic v suspenziji po izolaciji	
celokupno število izoliranih celic	
% ASC	
celokupno število ASC	
število ASC/mL maščobe	



**Slika 30: Matične celice iz maščobe, pasaža 3 (vir: Educell d.o.o.).**

## 11

## Vaja 5:

## Diferenciacija matičnih celic iz maščobnega tkiva

## EKSPERIMENTALNO DELO

## 1. ODMRZOVANJE CELIC

Za izvedbo diferenciacije lahko odmrzemo in nasadimo celice, ki smo jih predhodno že izolirali, gojili in dolgotrajno shranili v tekočem dušiku. Po odmrzovanju celice nasadimo v plošče z 12 luknjicami ter gojimo 1 teden oz. dokler povsem ne prerastejo gojitvene površine. Nato celicam dodamo ustrezno diferenciacijsko gojišče.

**Postopek odmrzovanja celic:**

Priprava gojišča za odmrzovanje:

- DMEM/F-12
- 20 % serum

Za odmrzovanje ene krioviale potrebujemo 5 mL gojišča.

Priprava gojilnega medija:

- DMEM/F-12
- 10 % serum
- 1  $\mu$ L/mL pen/strep (končna koncentracija 50 ug/mL)

Za posamezno luknjico v plošči z 12 luknjicami potrebujemo 1 mL gojišča.

- Kriovialo s celicami vzemi iz posode s tekočim dušikom in čim hitreje prenesi v vodno kopel, ki je segreta na 37 °C. Pri tem pazi, da ne omočiš pokrovčka krioviale.
- Kriovialo v vodni kopeli vrtil okoli vzdolžne osi, tako da se vsebina rahlo premeša.
- Ko je v krioviali zgolj še manjši kristal ledu, jo vzemi iz vodne kopeli in obriši do suhega.
- Zunanost krioviale obriši s 70-% alkoholom in prenesi v zaščitno mikrobiološko komoro.
- Vsebino krioviale po kapljicah prenesi v 15-mL centrifugirko s 5 mL predhodno segretega gojišča za odmrzovanje.
- Centrifugiraj 5 minut pri 400 x g.
- Odstrani supernatant in resuspendiraj celice v 1 – 2 mL gojilnega medija.
- Preštej žive celice.

### **Postopek nasajanja in gojenja celic:**

Za izvedbo adipogene in osteogene diferenciacije nasadi celice v 2 plošči z 12 luknjicami. V vsako izmed njih nasadi celice v 4 luknjice (2 luknjici za diferenciacijo in 2 za kontrolo). Celice nasadi v gostoti 10 000 celic/cm<sup>2</sup>. Površina ene luknjice v plošči z 12 luknjicami je približno 3,8 cm<sup>2</sup>.

- Preračunaj koliko celic in medija potrebuješ ter si pripravi ustrezno količino celične suspenzije za nasajanje. Pri izračunu upoštevaj, da si je potrebno zaradi napak pri pipetiranju pripraviti 10 % več celične suspenzije.
- Ustrezno označi gojitveno ploščo in prenesi po 1 mL celične suspenzije v posamezno luknjico.
- Gojišče menjujemo vsake 3 dni.

**Rezultate izračuna za nasajanje celic vpiši v tabelo:**

koncentracija celic v suspenziji po odmrzovanju	
celokupno število odmrznjenih celic	
število celic za nasajanje + 10 %	
celokupni volumen celične suspenzije za nasajanje + 10 %	

**Priprava \_\_\_ mL celične suspenzije za nasajanje:**

volumen celične suspenzije po odmrzovanju	
volumen gojilnega medija	

## **2. DIFERENCIACIJA ASC V ADIPOCITE**

Če izvajamo adipogeno diferenciacijo pogosto, je smiselno komponente diferenciacijskega gojišča kupiti posebej, ter nato pripraviti lastno mešanico gojišča. Na trgu obstajajo tudi komercialno dostopne mešanice, ki že vsebujejo vse potrebne snovi, vendar so običajno dražje.

## Postopek diferenciacije v adipocite:

Priprava adipoindukcijskega gojišča:

- DMEM/F12
- 10 % serum
- 10 µg/mL inzulin
- 1 µM deksametazon
- 200 µM indometacin
- 500 µM IBMX
- 50 ug/mL pen/strep

Za posamezno luknjico v plošči z 12 luknjicami potrebujemo 1 mL gojišča.

Ko celice povsem prerastejo gojitveno površino zamenjamo gojišče z adipoindukcijskim. V kontrolni skupini celice še naprej gojimo v gojitvenem mediju. Gojišče menjujemo vsake 3 dni.

**Količine sestavin za pripravo medija za adipogeno diferenciacijo vpiši v tabelo:**

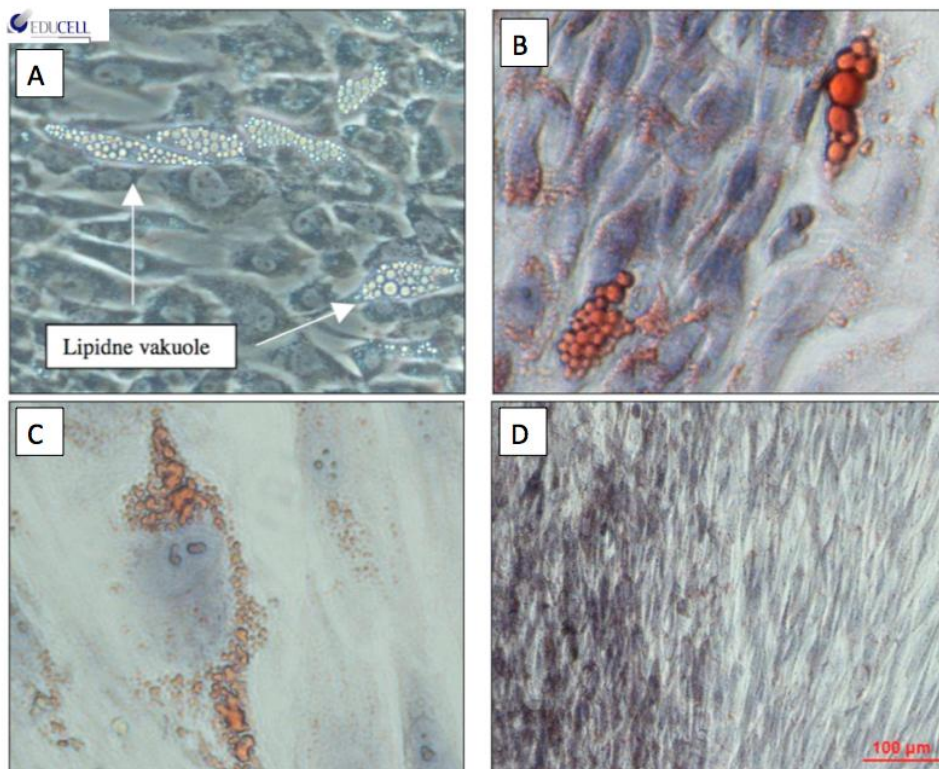
Sestavina	Začetna konc.	Končna konc.	Za ___ mL
DMEM/F12			
FBS	100 %	10 %	
inzulin	10 mg/mL	10 µg/mL	
deksametazon	10 µM	1 µM	
indometacin	36,3 mM	200 µM	
IBMX	45 mM	500 µM	
gentamicin	50 mg/mL	50 ug/mL	

## Detekcija maščobnih kapljic – »Red Oil O« barvanje

Med diferenciacijo v maščobne celice se začno v citoplazmi ASC kopičiti maščobne kapljice, ki se sčasoma zlivajo v večje. Zrela maščobna celica vsebuje pretežno maščobo, ki jo obdaja le tanka plast citoplazme.

### Postopek barvanja maščobnih kapljic:

- Odstrani gojišče in celice 2x spera s PBS.
- Fiksiraj celice v 4 % paraformaldehidu 10 min.
- Speraj z destilirano vodo.
- Inkubiraj v barvilu »Red Oil O« 10 min (lipofilno barvilo, ki se veže na lipidne vakuole in jih obarva rdeče).
- Speraj z destilirano vodo in pogledaj pod mikroskopom.



**Slika 31: Matične celice v kulturi lahko diferenciramo v adpilocite.**

Lipidne vakuole se pobarvajo rdeče (B,C). Neobarvana kultura (A), kontrolne celice kjer do diferenciacije ni prišlo (D) (vir: Educell d.o.o.).

### 3. DIFERENCIACIJA ASC V KOSTNE CELICE

#### Postopek diferenciacije v osteocite:

Priprava osteoindukcijskega gojišča:

- DMEM/F12
- 5 % serum
- 10 mM  $\beta$ -glicerofosfat
- 100 nM deksametazon
- 100  $\mu$ M askorbinska kislina
- 50  $\mu$ g/mL gentamicin

Za posamezno luknjico v plošči z 12 luknjicami.potrebujemo 1 mL gojišča.

Ko celice povsem prerastejo gojitveno površino zamenjamo gojišče z osteoindukcijskim. V kontrolni skupini celice še naprej gojimo v gojitvenem mediju. Gojišče menjujemo vsake 3 dni.

**Količine sestavin za pripravo medija za osteoindukcijo vpiši v tabelo:**

Sestavina	Začetna konc.	Končna konc.	Za ___ mL
DMEM/F12			
FBS	100 %	5 %	
$\beta$ -glicerofosfat	1 M	10 mM	
deksametazon	10 $\mu$ M	100 nM	
askorbinska kislina	5 mM	100 $\mu$ M	
gentamicin	50 mg/mL	50 $\mu$ g/mL	

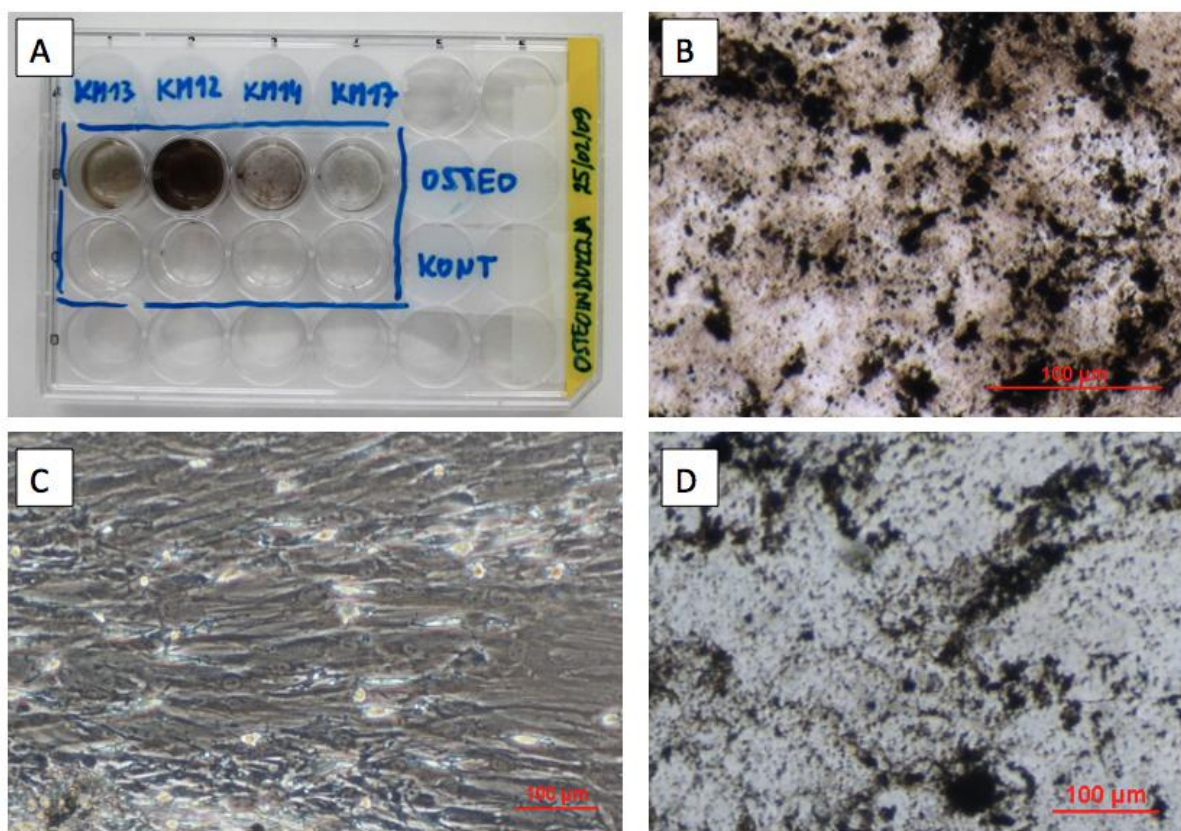
#### **Detekcija kalcijevih depozitov**

Diferencirani osteociti (zrele kostne celice) izločajo v matriks poleg kolagena I in nekaterih drugih proteinov tudi veliko kalcijevega fosfata, ki se nahaja v obliki kristalov hidroksiapatita in daje kostnini trdnost in togost. Za dokazovanje prisotnosti kalcijevega fosfata in karbonata se lahko uporabljata dve analizi, in sicer barvanje von Kossa ter kalcijev test.

#### Postopek barvanja von Kossa

Pri barvanju »von Kossa« srebro v srebrovem nitratu nadomesti kalcij v kalcijevi soli. Srebrova sol se pod vplivom svetlobe reducira in izloči se srebrova kovina, ki je temne barve.

- Odstrani gojišče in celice 2x sperij z mrzlim PBS.
- Fiksiraj celice s 4 % paraformaldehidom 15 minut.
- 2x sperij z destilirano vodo.
- Dodaj 2 raztopino srebrovega nitrata in 10 minut inkubiraj v temi.
- 3x sperij z destilirano vodo.
- Inkubiraj na svetlobi ali pod UV lučko 15-30 minut.
- 2x sperij z destilirano vodo in pogledj pod mikroskopom.



**Slika 32:** Črno obarvani kalcijevi depoziti so dokaz uspešne osteogene diferenciacije (A, B, D). Slika C prikazuje kontrolno skupino, kjer do nastanka depozitov ni prišlo.

## Postopek izvedbe kalcijevega testa

- Odstrani gojišče.
- Dodaj 5 % trikloroacetne kisline (TCA) - (1 mL TCA / 1 luknjico plošče z 12 luknjicami) in celice postrgaj z dna luknjice.
- Vse skupaj prenesi v epico in jo čim bolj premešaj (uporabi mešalnik).
- 30 minut inkubiraj na sobni T, vmes mešaj na 5-10 minut (uporabi mešalnik).
- Centrifugiraj 5 minut pri 300 x g – supernatant, ki ga dobimo po centrifugiranju, je naš **vzorec**.
- Pripravi reagent za barvanje: »color reagent« + »base reagent« v razmerju 1:1 (raztopino pusti stati 15 minut oz. jo pripravi 15 min pred uporabo).

Priprava **standardnih raztopin** za umeritveno krivuljo:

Standardna raztopina (μL)	TCA (μL)
a	0
b	2
c	4
d	6

Analizo izvajamo v mikrotiterski ploščici 96 luknjicami, v katero napipetiramo:

- 10 μL vzorca (supernatant) + 90 μL reagenta za barvanje
- 10 μL standardne raztopine + 90 μL reagenta za barvanje

S spektrofotometrom izmeri absorbanco pri 550 nm in 660 nm (ozadje).

Vrednosti za absorbance vpiši v spodnjo tabelo, odštej ozadje ter upoštevaj 10x redčitev vzorca z reagentom:

$$\text{Absorbanca} = (A_{550} - A_{660}) \times 10$$

Na osnovi dobljenih podatkov za standardne raztopine nariši graf – umeritveno krivuljo, ki prikazuje absorbanco v odvisnosti od koncentracije standarda (μg/mL). Iz enačbe umeritvene krivulje izračunaj X, ki nam pove, kakšna je koncentracija kalcija v vzorcu.

Standardne raztopine	A <sub>550</sub>	A <sub>660</sub>	Absorbanca = (A <sub>550</sub> - A <sub>660</sub> ) x 10	Končna koncentracija standarda (μg/mL)
a				0
b				20
c				40
d				60
<b>NAŠ VZOREC</b>				<b>X =</b>



koncentracija kalcija v vzorcu	
--------------------------------	--

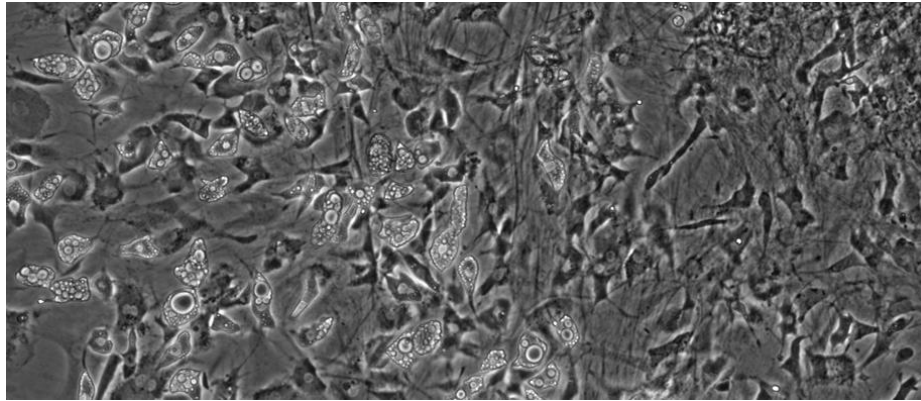
1. Katere vrste celic se nahajajo v suspenziji celic po izolaciji iz maščobnega tkiva?
2. Koliko pasaž bi morali gojiti izolirane ASC, da bi jih namnožili za terapevtsko dozo 100 milijonov celic (predpostavljaš, da se celice podvojijo 2x na pasažo)?
3. S katerim postopkom bi lahko še preverjali uspešnost diferenciacije? Na kratko opiši postopek.

## 12 Vaja 6: Izolacija in presaditev celic kostnega mozga pri miših kot model za razvoj genske terapije pri ljudeh

### Presaditev kostnega mozga bo omogočila zdravljenje genetskih bolezni

Zdravila za napredna zdravljenja predstavljajo pomembno usmeritev terapevtskih storitev v prihodnosti. Evropska agencija za zdravila jih definira kot zdravila za humano rabo, ki temeljijo na genski terapiji, tkivnem inženirstvu ali celični terapiji. Pri genski terapiji želimo popraviti enega ali več okvarjenih genov, ki so vzrok za bolezen. Pri genetskih boleznih krvotvornega in imunskega sistema lahko to storimo tako, da bolniku odvzamemo krvotvorne matične in predniške celice, jih v laboratoriju z gensko terapijo spremenimo, odpravimo zapis za nastanek bolezni, ter jih nato bolniku vrnemo nazaj. Če je teh spremenjenih celic po vrnitvi v kostni mozeg dovolj (dosežemo t.i. himerizem, kar pomeni obstoj celic, ki izhajajo iz dveh ali več organizmov v enem), ima bolnik dovolj zdravih krvotvornih matičnih in predniških celic, iz katerih se tvorijo zdrave krvne in imunske celice. Eden izmed ključnih dejavnikov takega zdravljenja je torej doseganje zadostnega himerizma pri bolniku. Kakšen delež presajenih zdravih celic zadostuje za ozdravljenje je odvisno od same genske bolezni. Pri srpastocelični anemiji, na primer, naj bi zadostovala prisotnost 10-30 % zdravih celic v kostnem mozgu. Običajno pri različnih drugih raziskavah, ki temeljijo na presaditvah krvotvornih matičnih celic, miši prejemnice najprej obsevajo in jim s tem uničijo njihov lasten kostni mozeg. V tem primeru lahko nato presaditev razmeroma majhnega števila matičnih

celic kostni mozeg popolnoma obnovi. Celice se naselijo v izpraznjenem okolju kostnega mozga in tvorijo zrele krvne in imunske celice. Na ta način lahko dosežemo tudi do 100 % himerizem. Bolnikov, ki so v postopku zdravljenja z gensko terapijo, pred presaditvijo ne želimo obsevati, ker ima obsevanje veliko nezaželenih stranskih učinkov. Doseči himerizem brez predhodnega praznjenja okolja kostnega mozga je veliko težje, saj so okolja v kostnem mozgu s celicami že zapolnjena.



**Slika 33: Dolgotrajna kultura celic kostnega mozga gojena v laboratoriju.** Predstavlja okolje v katerem se v kostnem mozgu nahajajo matične celice. Na levem delu slike so vidne tudi celice maščobnega tkiva z maščobnimi kapljicami.

Za ugotavljanje koliko zdravih krvotvornih matičnih in predniških celic moramo presaditi, da dosežemo himerizem, ki bi lahko odpravil bolezen, lahko uporabimo živalski model presaditve celic kostnega mozga, kjer mišim presadimo celice brez predhodne radio- ali kemoterapije. V naši raziskavi kjer so imele miši prejemnice nedotaknjen kostni mozeg, smo ugotovili, da jim moramo presaditi zelo veliko število celic kostnega mozga (med katerimi se nahajajo tudi matične celice), da dosežemo terapevtsko pomemben himerizem. Ugotovili smo, da himerizem narašča linearno v odvisnosti od števila presajenih celic, in sicer, da se za vsak milijon presajenih celic poveča za 0,16 %. Mišim smo presadili 125 milijonov celic kostnega mozga darovalcev (kar predstavlja približno četrtino celotnega kostnega mozga ene miši) in dosegli povprečno 20 % himerizem. Rezultate pridobljene na miših smo nato teoretično prenesli na človeka. Pri tem se zavedamo, da ima izračun precej omejitev, a je hkrati poleg matematičnega modeliranja edini način, da ocenimo, koliko krvotvornih matičnih celic potrebujemo za doseganje terapevtsko pomembnega himerizma pri ljudeh. Podatkov o presaditvah kostnega mozga pri ljudeh, ki niso prejeli radio- ali kemoterapije namreč nimamo, prav tako pa klinične študije na tem področju zaradi etičnih pomislekov niso izvedljive.

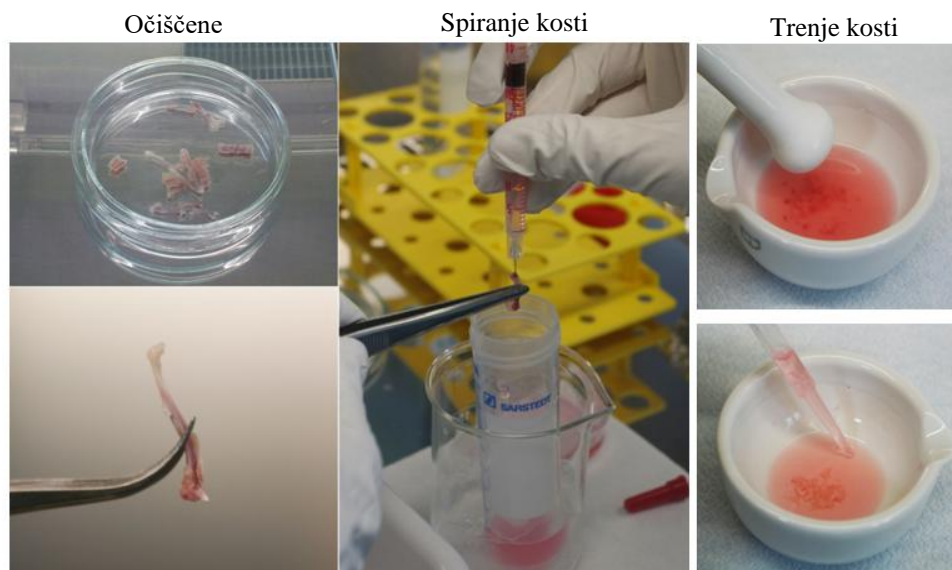
Po naših izračunih za doseganje 20 % himerizma potrebujemo 44 milijonov matičnih in progenitorskih celic – te so pri človeku poznane kot celice z oznako CD34+. Zaradi razlik med mišim in človekom smo vzeli v ozir, da je ta doza lahko tudi desetkrat višja. V obeh primerih standardni postopek zbiranja krvotvornih matičnih in progenitorskih celic iz mobilizirane periferne krvi, ki se rutinsko uporablja pri presaditvah kostnega mozga, zadostuje za pridobitev dovolj velikega števila celic, ki bi lahko po postopkih genske terapije omogočal zdravljenje prirojenih bolezni.

## Miši kot model za presaditev kostnega mozga – izolacija kostnega mozga pri miših

Pri miših se kostni mozeg nahaja v votlih in ploščatih kosteh, v njem pa poteka hematopoeza od rojstva do starosti. Poleg krvotvornih matičnih in progenitorskih celic kostni mozeg vsebuje tudi mezenhimske stromalne/matične celice, osteoblaste, endotelijske celice, adipocite, živčne celice in druge celice. Danes je splošno sprejeto, da se matične in progenitorske celice v kostnem mozgu nahajajo ob kosti v območju endosta, njihovo število pa se zmanjšuje proti osrednjemu delu kosti.

Splošno razširjen postopek izolacije kostnega mozga pri miših poteka tako, da dolgim votlim kostem nog (tibia, humeri in femur) odrežemo konce kosti, vstavimo injekcijsko iglo in z gojilnim medijem ali PBS speremo kostni mozeg iz osrednjega dela (slika 34). Ta način ima več omejitev. Prvič, lahko za izolacijo uporabimo le votle kosti, in drugič, po izolaciji ostaja neizpran še določen del celic ob delu zunanega roba kosti, kjer je večje število krvotvornih matičnih in progenitorskih celic. Za raziskave, v katerih je potrebno veliko število krvotvornih matičnih in progenitorskih celic, mezenhimskih stromalnih/matičnih celic ali celic kostnega mozga, raziskovalci pogosto združujejo izolirane celice večjega števila živali.

Obstaja pa tudi manj znan postopek izolacije celic kostnega mozga s trenjem kosti, ki omogoča pridobivanje večjega števila celic iz ene miši kot spiranje (slika 34). Pri tem postopku lahko za izolacijo uporabimo več kosti pri posamezni miši – uporabimo lahko katero koli kost, najpogosteje pa so to stegnenica, golenica, nadlahtnica, črevnica in kosti hrbtenice. Kost očistimo, kar pomeni da odstranimo mišice in vezivno tkivo, jih stremo v terilnici ter izplavljene celice prefiltriramo, da odstranimo delce strtih kosti. Dodatna prednost izolacije s trenjem je, da pridobimo tudi več matičnih celic, ki se nahajajo v mikrokoljih ob kosti, ki so sicer s postopkom izpiranja manj dostopni.



**Slika 34:** Na sliki je prikazan postopek spiranja in trenja kosti za izolacijo celic kostnega mozga. Na levem delu slike so prikazane kosti po čiščenju. Očiščene kosti nato uporabimo za izolacijo kostnega mozga s spiranjem (osrednji del slike) ali s trenjem v terilnici (desno).

Kljub trudu mnogih raziskovalcev je mišje mezenhimske stromalne/matične celice še vedno težko gojiti in vitro. Glavne težave so v majhnem številu izoliranih celic, slabem namnoževanju in kontaminaciji kultur z drugimi krvnimi celicami. Prvo težavo raziskovalci rešujejo tako, da za izolacijo mezenhimskih stromalnih/matičnih celic združijo 4 – 5 miši. Ostali dve pa lahko premagamo z izbiro ustreznega gojilnega medija in pogojev gojenja. Protokol trenja kosti za izolacijo kostnega mozga omogoča izolacijo dovolj velikega števila celic, da lahko iz ene posamezne miši pridobimo dovolj mezenhimskih stromalnih/matičnih celic za večino nadaljnjih aplikacij.

Biomedicinske raziskave, ki so bile opravljene na živalih, so prinesle znaten napredek v kvaliteti življenja ljudi, pa tudi v zdravju živali in varnosti našega okolja, prehrane ter kozmetičnih in drugih komercialnih produktov. V vsakdanjem življenju se danes tako ni mogoče izogniti posredni ali neposredni uporabi rezultatov raziskav na živalih. Že dolgo pa se v znanosti spodbuja prizadevanja za razvoj alternativnih metod, ki omogočajo zamenjavo živali v poskusih, npr. s celičnimi kulturami, z računalniškim modeliranjem ali pa z vpeljavo metod, ki omogočajo vsaj zmanjšanje števila poskusnih živali. Pri raziskavah povezanih s presaditvami krvotvornih matičnih in progenitorskih celic se uporabi poskusnih živali ne moremo izogniti. Lahko pa razvijamo metode, s katerimi kar najbolj stremimo k zmanjšanju njihovega števila.

\*Danes je znano, da populacija matičnih celic vsebuje tudi razne bolj zrele predniške celice, ki imajo manjši potencial za razvoj v različne celične vrste kot prave matične celice.

## EKSPERIMENTALNO DELO

### 1. PROTOKOL TRENJA KOSTI ZA PRIDOBITEV CELIC KOSTNEGA MOZGA PRI MIŠIH

Material:

a) medij za pridobitev KM (RPMI+):

- brezbarvni RPMI-1640 z dodanim 25 mM HEPES (pH 7,0 – 7,5) in L-glutaminom (300 mg/l)
- 1 mM EDTA
- 1X PenStrep (penicilin (100 E/ml) + streptomycin (100 µg))

b) PBS

c) 1X PharmLyse Buffer

d) 70 % etanol

e) razkužilo Asepsol (5 % raztopina)

f) sterilna rezila (2 kosa), škarje (2 kosa) in pincete (2 kosa)

g) sterilna gaza

h) steriliziran terilnik in pestilo

i) petrijevke (60 mm) in centrifugirke (50 ml)

j) 40 µm-najlonska sita (Falcon)

k) 30 µm-najlonska sita (Miltenyi)

l) Pasteurjeve pipete

m) pipete in konice za pipete s filtrom

n) epice

o) centrifuga z nadzirano temperaturo

p) brezprašna komora

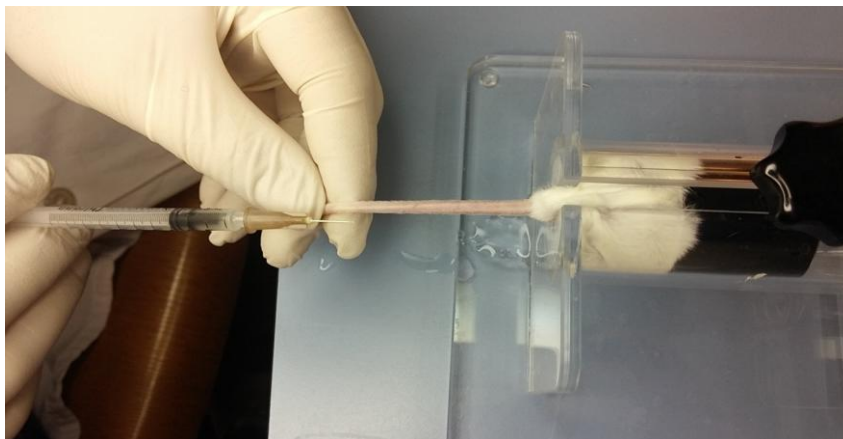
q) banjica z ledom

Delo naj poteka v brezprašni komori. Vse uporabljene raztopine in orodje mora biti sterilno. Medije, ki se jih uporablja med postopkom, se postavi v banjico z ledom. Tudi petrijevke, v katere se polaga kosti, se postavi na led.

### **Postopek:**

1. Evtanazirane miši za 5 minut potopite v 5 % raztopino Asepsol. Za tem jih položite na sterilno podlago. Ves čas ekstrakcije vse dobro razkužujte z alkoholom.
2. Kožo zarežite na hrbtnem delu in jo s prsti povlecite narazen navzgor in navzdol. Škarje in pinceto, ki ju uporabite za rezanje kože, zavžite in pri nadaljnjem delu uporabite svež komplet.
3. Z rezi odstranite glavne kosti: po dve golenici (tibia), stegnenici (femur), nadlahtnici (humerus) in črevnici (ilium).
4. Golenico odstranite tako, da zarežete v vezivno tkivo nad kolonom in v mišice pod kolonom. Za tem zarežite skozi koleno, ločite golenico in jo potegnite ven iz kože. Pri odstranjevanju bodite previdni, da polomite kosti.
5. S škarjami nato od golenice ločite še stopalo in odstranite mišice, kolikor gre. Kost postavite v RPMI+ na ledu.
6. Steglenico odstranite tako, da prerežete mišice ter jih postrgate dol. Izpahnite jo iz sklepa ter položite v medij.
7. Na enak način izrežite še obe nadlahtnici in obe črevnici.
8. Odstranjene kosti, ki so se jih držijo mišice in vezivo, za 5 minut položite v 60 mm petrijevko na ledu, ki vsebuje mrzel medij za pridobitev KM, da se je tkivo zmehča.
9. Za odstranitev hrbtenice odrežite rep in nato režite ob hrbtenici spodaj, levo in desno, pri čemer pazite, da ne zarežete v peritonej.
10. Pripravite sveže rezilo (skalpel).
11. Vsako odstranjeno kost posebej primite s pinceto in jo na sterilni podlagi očistite mišičnega in vezivnega tkiva. Tudi hrbtenico dobro očistite, jo na štirih mestih prerežite in s pomočjo igle odstranite tudi hrbtenjačo.
12. Vse kosti obrišite z gazo in jih položite nazaj v RPMI+.
13. Očiščene kosti za 2 minuti namočite v 70 % etanolu.
14. Kost nato prenesite v PBS, s čimer sperete etanol ter jih postavite v petrijevko z medijem za pridobitev KM.
15. TRENJE: Očiščene kosti prenesite v sterilni terilnik, ki vsebuje nekaj ml medija za pridobitev KM (običajno za kosti ene miške se porabi okoli 6 ml medija).
16. S tolkačem strite kosti v fragmente. Najprej strite kosti (2x tibia, 2x femur, 2x humerus in 2x ilium) in nato hrbtenico. Trite toliko časa, dokler se sliši »škrtanje«, pri čemer bodite pozorni, da kosti ne strete v fin prah.
17. Po trenju suspenzijo vbrizgavajte in izbrizgavajte s pipeto, da premešate celice, in jih odpipetirate skozi 40 µm-najlonsko sito v 50 ml-centrifugirko. Pred filtriranjem mrežo sita omočite z medijem.
18. Kostem, ki ostanejo v terilniku ponovno dodajte medij in ponovite trenje, celice premešajte s pipeto in jih odpipetirajte skozi 40 µm-najlonsko sito v centrifugirko. Kost, ki ostanejo, so po trenju zelo svetle.
19. Enak postopek ponovite pri trenju hrbtenice. Najbolje je to narediti s svežim sitom in ločeno centrifugirko.

20. Ko imate celično suspenzijo zbrano, jo ponovno prefiltrirajte skozi sveže 40  $\mu\text{m}$ -najlonsko sito. Po filtraciji z medijem še malce sperite sito.
21. Celično suspenzijo nato centrifugirajte 5 minut pri 490 x g, pri 4 °C.
22. Supernatant previdno odstranite in s centrifugirkami podrgnite po nosilcu, preden nadaljujete (s tem naj bi preprečili nastanek strdkov).
23. LIZA ERITROCITOV: Celice resuspendirate v 5 ml 1X PharmLyse Buffer za 3 min v temi. Po poteku treh minut, celice takoj sperete s 30 ml PBS s heparinom in centrifugirate 5 minut pri 490 x g.
24. Supernatant previdno odstranimo tako, da iz obeh centrifugirk vse celice združite v eno ter ponovno sperete s 30 ml PBS in heparinom.
25. Suspenzijo ponovno centrifugirajte 5 minut pri 490 x g, pri 4 °C in odstranite supernatant in s centrifugirkami podrgnite po nosilcu.
26. Celice postavite v ledeno kopel in odvzemeti vzoreček za štetje celic.
27. PRIPRAVA ZA PRESADITEV: Preračunajte v kolikšnem volumnu PBS morate resuspendirati celice, da boste lahko pripravili brizge za posamezne presaditve. Pri tem morate upoštevati, da boste volumen suspenzije povečali za 200  $\mu\text{l}$  pri spiranju 30  $\mu\text{m}$ -sita (Miltenyi).
28. Pripravite epico, katero boste prefiltrirali celično suspenzijo, in nanjo postavite (držite) 30  $\mu\text{m}$ -sito. S 100  $\mu\text{l}$  PBS zmočite sito in nato skozi vbrizgnite celično suspenzijo. Ker se celice oprimejo sita, s pomočjo Pasteurjeve pipete celice pihnite navzdol. Za tem sito sperite s 100  $\mu\text{l}$  ter ponovno pihnite s Pasteujevo pipeto.
29. Celično suspenzijo porazdelite v brizge in čim prej opravite presaditev celic.

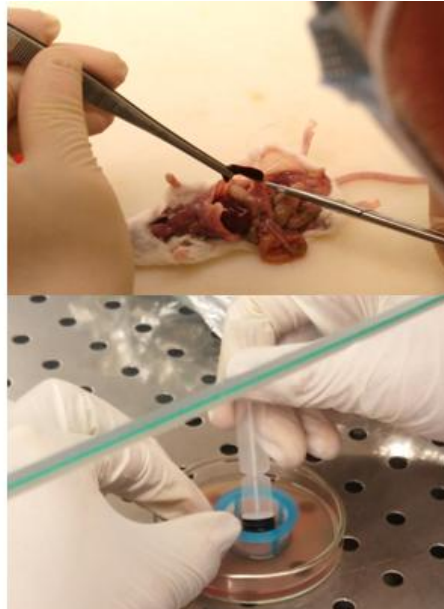


**Slika 35: Presaditev kostnega mozga pri miši z injeciranjem donorjevih celic v repno veno.**

## 2. IZOLACIJA SPLENOCITOV

1. Pripravimo petrijevko in filter, ki ga omočimo z medijem in postavimo vanj izolirano tkivo vranice.
2. Za trenje potrebujemo injekcijsko brizgo. Uporabimo le notranji del s črno gumo, s katero tudi pritiskamo vranico ob filter. Trenje je opravljeno, ko ostane le še vezivno tkivo vranice.
3. Filter dobro speremo z medijem, da speremo čim več celic. Medij s celicami prenesemo v centrifugirko.
4. Celično suspenzijo centrifugiramo 5 minut pri 490 x g, pri sobni temperaturi. Odstranimo supernatant in usedlino pretresemo.

5. Sledi liza eritrocitov z liznim pufrom v razmerju 1:10. Liza naj potek 3 minute v temnem prostoru. Po preteklem času se celice spere z 30 mL PBS pufra in centrifugiramo 5 minut pri 490 x g.
6. Supernatant odstranimo in ponovno spiramo z 30 mL PBS pufrom in centrifugiramo 5 minut pri 490 x g.
7. Celice pripravimo za štetje.



Slika 36: Izolacija splenocitov

### 3. DOLOČANJE HIMERIZMA PO PRESADITVI KOSTNEGA MOZGA

KMPC se v posebnem mikrookolju imenovanem niša nahajajo v kostnem mozgu dolgih in ploščatih kosti. To, da presajene celice po injiciranju v periferno veno same od sebe potujejo v kostni mozeg in se ugnezdijo v niše ter rekonstituirajo krvotvorni sistem je izredno zanimivo. Za uspešno ugnezditev ni potrebna nobena dodatna *in vitro* obdelava KMPC ali posebno tretiranje prejemnika celic. Kaj se po presaditvi s celicami dogaja raziskovalci proučujejo že vrsto let. V zadnjih letih je dvofotonska intravitalna mikroskopija omogočila opazovanje pritrditve, ugezditev in vsaditve KMC pri živih organizmih. *In vivo* spremljanje dogajanja je potrdilo prejšnja opažanja dognana z drugačnimi metodologijami. Ugotovili so, da v 12-48 urah po presaditvi celice prispejo v niše ob endostu. Po 52-60 urah pa so že opazili majhne kolonije, ki so se potem hitro povečevale in naselile kostni mozeg. Ko se presajene celice vsadijo v niše, začno ustvarjati zrele krvne celice in se samoobnavljati. Kadar spremljamo dolgotrajno vsaditev (long-term engraftment) himerizem določamo vsaj 12 tednov po presaditvi. V tem času tudi že razpade večina zrelih krvnih celic, ki smo jih ob presaditvi injicirali skupaj s KMPC. Himerizem lahko določamo v periferni krvi, kostnem mozgu, splenocitih ali pa v izbranih populacijah imunskih celic. Nevtrofilci imajo kratko življenjsko dobo ter se ne delijo zato himerizem določen na izolirani populaciji nevtrofilcev najnatančneje predstavlja nivo proliferacije in diferenciacije vsajenih donorjevih matičnih celic.

Za sledenje himerizma imamo na voljo več sistemov. Osnova pri vseh je, da donorjeve celice kostnega mozga na tak ali drugačen način ločimo od prejemnikovih. Vedno je pri tem potrebno vzeti v ozir kakšna je ta razlika ter njen vpliv na prejemnikov (predvsem pri nekondicioniranih presaditvah) imunski sistem (imunogenost presadka).

Prikaz vaje:

1. Donorjeve celice pobarvamo z dolgo obstojnimi fluorescenčnimi barvili (npr. PKH26) ali pa kot donorje uporabimo GFP+ miši.
2. Kongeni sevi – sevi miši, ki se ločijo le po označevalcu CD45. In sicer je en sev CD45.1 in drugi CD45.2 (imenovani tudi Ly5.1 in Ly5.2). Donorjeve in prejemnikove krvne celice lahko ločimo s pretočno citometrijo.
3. Y kromosom – izberemo miši prejemnice in jim presadimo kostni mozeg darovalcev moškega spola. Z metodo PCR lahko določamo himerizem na osnovi določanja deleža celic z Y kromosomom.

### **Določanje himerizma po presaditvi kostnega mozga z metodo PCR v realnem času**

Iz vzorcev kostnega mozga, splenocitov ali drugih po presaditvi izoliramo DNA. Pripravimo mešanico moške in ženske DNA za umeritveno krivuljo (% moške DNA v ženski DNA: 0,2 - 0,5 - 2,5 - 12,5 - 50 - 87,5 - 100). Pripravimo reakcije za PCR pri čemer uporabimo dva seta oligonukleotidnih začetnikov: Zfy1 je gen, ki se nahaja na Y kromosomu in gen Bcl2, ki je endogena kontrola, ki je prisotna tako v moških kot ženskih celicah. Gen Bcl2 uporabimo za normalizacijo količine DNA v posamezni reakciji pri različnih vzorcih. Himerizem se nato določi na osnovi primerjave eksperimentalnih vzorcev z umeritveno krivuljo.

#### **PONAVLJANJE**

1. Zakaj je postopek trenja kosti boljši kot postopek spiranja kosti za izolacijo kostnega mozga?
2. Naštej dve slabosti uporabe fluorescenčnih barvil za sledenje himerizma.
3. Zakaj pri pravi umeritvene krivulje za določanje himerizma z metodo PCR v realnem času moške DNA ne mešamo kar v vodi?
4. Zakaj mediju za izolacijo kostnega mozga dodamo HEPES in EDTA?



## 13 Vaja 7: Funkcijski celični testi in vitro

Različne teste, ki se izvajajo v laboratorijih v raziskovane ali diagnostične namene lahko razdelimo v dve skupini: teste s katerimi preverjamo prisotnost/odsotnost določenih fenotipskih označevalcev in drugih molekul ali spojin in funkcijske teste s katerimi določamo sam odziv celic na določene pogoje.

### Funkcijski celični testi in vitro

Funkcijski testi so izredno pomembni, saj omogočajo proučevanje dejanske funkcije celic in so torej tisti, ki nam dajo resnično relevanten odgovor na zastavljeno vprašanje. S funkcijskimi testi pogosto proučujemo odziv celic na določen signal ali okolje. Z njimi lahko ugotovljamo tudi razlike med celicami v neki populaciji za katere nimamo fenotipskih označevalcev. Pogosto se funkcijski testi uporabljajo za spremljanje delovanja imunskih celic. Izvedba funkcijskih testov je zahtevna in pogosto časovno dolgotrajna. Potrebno je imeti vir celic oz. tkiva ter ustrezno opremo za njihovo manipulacijo. Diagnostične funkcijske teste običajno izvajajo v referenčnih laboratorijih, ki so ustrezno opremljeni in imajo zadostno strokovno znanje. Pri funkcijskih testih se srečamo z večjo biološko variabilnostjo kot pri klasičnih testih in jih je včasih težko interpretirati.

Diagnostični primer funkcijskega testa, ki se izvaja na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, je test za določanje od heparina izzvanih protiteles v krvi bolnika. Določeni bolniki, ki preventivno ali v okviru terapije prejemajo heparin, razvijejo protitelesa, ki lahko povzročijo tudi smrt. Prisotnost potogenih od heparina izzvanih protiteles v krvi lahko dokažemo samo s funkcijskim testom.

### Tkivne kulture za testiranje farmacevtskih učinkovin

Iskanje novih zdravilnih učinkovin ali biomaterialov za uporabo v medicini se lahko prične s testiranjem njihovega učinka na tkivnih kulturah. Npr. funkcionalno testiranje učinkovin, ki vplivajo na hrustančno tkivo, in testiranje biomaterialov ter učinkovin za uporabo v regeneraciji kosti.

Pojavljati se začne tudi nov model kliničnih študij *in vitro*. Določanje stranskih učinkov zdravil za npr. zdravljenje bolezni srca. Zdravila so lahko namreč varna za večino populacije, pri ljudeh z določenim genetskim ozadjem pa se izkažejo za škodljiva. Pri tem lahko uporabimo celice iPS pridobljene iz bolnikov z dednimi srčnimi boleznimi, jih v laboratoriju spremenimo v zrele utripajoče srčne celice na katerih nato testiramo zdravila. Cilj je, da bi v prihodnosti testirali zdravila na takih zbirkah z npr. 1000 celičnimi linijami z različnim genetskim in etničnim ozadjem.

Glavna prednost uporabe celičnih kultur za katerega koli od zgoraj naštetih namenov je stalnost in ponovljivost rezultatov, ki sta zagotovljeni z uporabo iste serije celic. Slabost

celičnih kultur pa je, da se tekom kontinuirane rasti karakteristike celic v kulturah lahko spremenijo in postanejo precej različne od začetne populacije.

## **Spremljanje migracije/invazivnosti celic s testom celjenja ran**

Celjenje rane v pogojih *in vivo* je sestavljeno iz urejenega zaporedja dogodkov, ki vodijo v popravilo tkiva. Imunske celice, ki pridejo na mesto poškodbe, odstranijo uničeno in nekrotično tkivo, angiogeni dejavniki spodbujajo povečano vaskularizacijo, povečana proliferacija celic in izgradnja zunajceličnega matriksa pa zapolnita rano. Celjenje rane se začne s spremembo orientacije celic, nastajanjem izrastkov in migracijo celic dokler ne zaprejo rane. Ta proces *in vitro* zelo poenostavljeno posnemamo s testom celjenja ran. Test omogoča študij migracije celic, proliferacije in medceličnih interakcij. Pri tem lahko uporabimo različne eksperimentalne pogoje (npr. medij s serumom, medij brez seruma, določene farmacevtske učinkovine kot dodatek h gojilnemu mediju, gensko spremenjene celice) in proučujemo njihov vpliv na migracijo in proliferacijo celic. Sam test poteka tako, da naredimo »rano« - opraskamo monosloj celic - ter nato opazujemo »celjenje« rane s spremljanjem migracije in proliferacije celic proti sredini praske. Prednosti testa so, da je poceni, enostaven in omogoča hkratno proučevanje najrazličnejših eksperimentalnih pogojev. Ključna slabost testa je, da je njegova izvedba slabo standardizirana, kar onemogoča neposredno primerjavo med poskusi izvedenimi v različnih laboratorijih, oteži pa tudi primerjavo med tehničnimi ponovitvami.

## **Fagocitoza**

Fagocitoza je proces pri katerem celice požrejo in razgradijo celice ali dele celic. V prvi stopnji požiranja se fagocit (celica sposobna fagocitoze) približa delcu, ki ga bo pogoltnil. Prisloni se obenj in ga obda z membrano tako, da nastane fagosom. Fagosom se odcepi od membrane in sprosti v citoplazmo kjer poteče nadaljnja razgradnja delcev z encimi. Fagocitoza je pomemben proces pri prirojenem imunskem sistemu s katerim se odstranjujejo patogeni in razpadle celice. Bolniki pri katerih je okvarjen proces fagocitoze, pogosto zbolevalo za okužbami. Fagocitoze so zmožne vse celice, je pa ta sposobnost še posebej izražena pri fagocitnih celicah oziroma fagocitih. Med fagocite sodijo nevtrofilni granulociti in monociti oziroma makrofagi. Fagocitoza ima tudi pomembno vlogo pri predstavitvi antigenov imunskim celicam. Pri fagocitozi morajo fagociti predhodno tujke tudi prepoznati, kar jim omogočajo ustrezni receptorji. Kemična zgradba tujkov močno vpliva na potek fagocitoze, saj se mikrobi s kapsulo upirajo temu procesu, če niso navzoče ustrezne snovi, ki olajšajo fagocitozo (opsonini), in komplement.

## ***Monocyte monolayer assay* (MMA) in eritrofagocitoza**

MMA je *in vitro* test, ki je bil v osnovi razvit za boljše napovedovanje odziva na transfuzijo krvi pri bolnikih z avto- ali aloprotitelesi proti eritrocitnim antigenom. S testom se ugotavlja vpliv eritrocitnih protiteles na z Fc $\gamma$  receptorjem pogojeno fagocitozo. Rezultati tega *in vitro* testa napovedujejo klinične

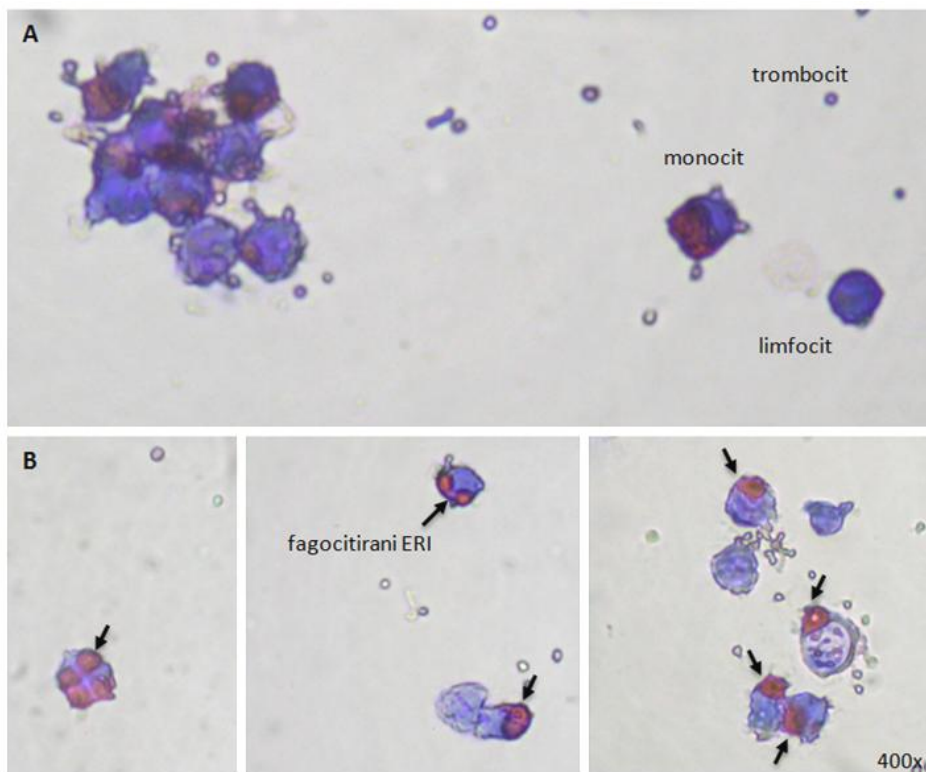
posledice take transfuzije. Test nam pomaga izbrati kri, ki je sicer serološko nekompatibilna z bolnikovo vendar ne povzroča nezaželenih reakcij po transfuziji. Standarden postopek za iskanje skladne krvi namreč vključuje serološko testiranje, kjer se določa ABO in Rh antigene pri bolniku ter testiranje na prisotnost eritrocitnih protiteles. Če so ta anti-eritrocitna protitelesa prisotna, jih je potrebno identificirati ter nato poiskati skladno kri, katerih celice ne vsebujejo teh antigenov. Obstaja majhna skupina ljudi, ki so bili aloimunizirani zaradi ponavljajočih se transfuzij ali nosečnosti. Nekateri imajo protitelesa tudi proti antigenom, ki so široko in močno zastopani v splošni populaciji in je zanje zato težko najti skladno kri. Nekatera aloprotitelesa pa niso klinično pomembna, se pravi da samo njihova prisotnost ne pomeni nujno tudi hemolize kadar bi bolnik dobil neskladno kri. S testom MMA določamo klinično pomembnost serološko nekompatibilne krvi pri transfuziji.

### **Izvedba testa MMA**

Za izvedbo testa potrebujemo bolnikove monocite, njegov serum ali plazmo, ki vsebuje protitelesa ter vzorec krvi, ki jo nameravamo uporabiti za transfuzijo.

Najprej iz bolnikove krvi z gradientnim centrifugiranjem izoliramo mononuklearne celice (MNC). MNC nasadimo v gojilne posodice in inkubiramo v celičnem inkubatorju na 37°C in 5% CO<sub>2</sub> 1 uro. V tem času se monociti pritrdijo na plastiko ostale celice pa po inkubaciji nežno speremo. Eritrocite, iz enote krvi namenjene transfuziji, operemo ter nato inkubiramo skupaj z bolnikovim serumom, ki vsebuje eritrocitna protitelesa. Po inkubaciji eritrocite dodamo monocitom v gojilno posodico in ponovno inkubiramo v celičnem inkubatorju, da poteče fagocitoza. Po inkubaciji celice pobarvamo z barvilom Wreight-giemsma ter preštujemo število fagocitiranih eritrocitov.

Ekstravaskularna hemoliza je odvisna od protiteles vezanih na eritrocite (rečemo, da so eritrociti opsonizirani s protitelesi). Če so bila v serumu bolnika prisotna protitelesa, ki so se vezala na eritrocite v enoti krvi namenjeni za transfuzijo, bo prišlo do fagocitoze, kot je vidna na spodnjih slikah (slika 37).



**Slika 37: Monocyte monolayer assay.** Pritrjenim monocitom smo dodali opsonizirane eritrocite. Po inkubaciji smo vzorec pobarvali in opazovali fagocitozo. A) V vzorcu so poleg monocitov prisotni tudi trombociti in limfociti. B) Monociti so fagocitirali enega ali več eritrocitov (puščice). Okrajšave: ERI – eritrocit. FI=  $(315/553) \times 100 = 57 \%$

## EKSPERIMENTALNO DELO

### 1. IZOLACIJA MONONUKLEARNIH CELIC IZ PERIFERNE KRVI ALI IZ FRAKCIJE KRVI BOGATE Z LEVKOCITI

#### Postopek:

1. Za odvzem polne krvi je priporočena uporaba antikoagulant ACD (*»acid-citrate-dextrose«*).
2. Kri lahko hranimo na sobni temperaturi do 36 ur. Daljši čas hranjenja lahko negativno vpliva na rezultate. Za izvedbo testa potrebujemo 10 mL polne krvi.
3. Z levkociti bogata frakcija naj ne bi bila starejša od 8 ur.
4. Iz 12 mL z levkociti bogate frakcije po ločevanju na fikolu in spiranju dobimo 40 – 50 x 10<sup>6</sup> MNC.
5. Iz 10 mL krvi po ločevanju na fikolu in spiranju dobimo 10 x 10<sup>6</sup> MNC.
6. Kri/z levkociti bogato frakcijo redčimo z DPBS v razmerju 1:1 (50 mL DPBS + 50 mL krvi)
7. Kri/z levkociti bogato frakcijo redčimo z DPBS v razmerju 1:1 (50 mL DPBS + 50 mL krvi)

8. V **50 mL** epruveto dodamo 11,5 mL ločevalnega medija Lympholyte (#CL5015) **ogretega na sobno temperaturo(!)** + 1 mL DPBS.
9. Na to naneseemo 25 mL redčene krvi.
10. Centrifugiramo 15 min na 950 x g, zavora in pospešek 1, T = 21°C.
11. Po centrifugiranju poberemo sloj MNC, ki je viden na meji med ločevalnim medijem in plazmo.
12. Epruveto do vrha dopolnimo z DPBS.
13. Centrifugiramo 10 min na 600 x g, zavora in pospešek, T = 21°C.
14. **Kri:** ta korak izpustimo

**Z levkociti bogata frakcija:** Da odstranimo trombocite nato centrifugiramo 10 min na 120 x g v 15 mL centrifugirki napoljeni do vrha z DPBS. Odstranimo supernatant do 2.5 mL. Dodamo 5 mL DPBS, premešamo in normalno spiramo naprej → 300 x g, 10 min, sobna T

15. Odvisno od količine trombocitov spiramo **2x** → 300 x g, 10 min, sobna T (pri krvi spiramo 1x)
16. Pelet resuspendiramo v ustreznem volumnu medija za fagocitozo (RPMI + 10 % FBS).

## 2. NASADITEV MNC

1. Uporabimo gojilne ploščice s štirimi komorami (»4 chamber slide«) - površina vsake luknjice znaša 1,8 cm<sup>2</sup> ali ploščo z 48 luknjicami (površina luknjice 0.75 cm<sup>2</sup>).
2. Pripravimo gojilne ploščice s štirimi komorami in nasadimo po 1,8 x 10<sup>6</sup> MNC na luknjico v cca 300 µL medija.
3. Ploščice inkubiramo **1 uro** v inkubatorju na 37°C in 5 % CO<sub>2</sub>. Medtem se monociti pritrdijo na podlago ploščice.

## 3. OPSONIZACIJA ERITROCITOV

Za opsonizacijo eritrocitov uporabljamo RhophyLac 300, Imunoglobulin anti-D, humani 300 µg /2 ml. Pri tem upoštevamo, da 0,5 ml koncentriranih Rh(D)-pozitivnih eritrocitov ali 1 ml Rh(D)-pozitivne krvi nevtraliziramo s približno 10 mikrogrami (50 i.e.) imunoglobulina anti-D.

1. Potrebujemo **250-500 µL** krvi ali koncentriranih ERI
2. 3x spiramo s fiziološko raztopino: **300 x g, 3 min** – pelet = koncentrirani ERI

3. 1 : 1 koncentrirani ERI : RhophyLac → po spiranju zmešamo **20 µL** koncentriranih ERI (oz glej spodnjo tabelo – odvisno koliko luknjic fagocitoze delaš) + 20 µL RhophyLac.
4. Inkubacija 1 h na 37°C.
5. 3x spiranje s fiziološko raztopino: **300 x g, 3 min.**
6. Po zadnjem spiranju odstranimo čim več fiziološke – volumen konc. ERI bi bil idealno **20 µL**.
7. Priprava 1.25 % V/V suspenzije eritrocitov z medijem za fagocitozo:

# luknjic	Površina gojilne posode	V opsoniziranih konc. ERI	V medija za fagocitozo	Skupni volumen
1	1 cm <sup>2</sup>	4,2 µL	295,8 µL	300 µL
2	1,8 cm <sup>2</sup>	7,5 µL	592,5 µL	600 µL
3	3,6 cm <sup>2</sup>	15 µL	1185 µL	1200 µL
4	5,4 cm <sup>2</sup>	22,5 µL	1777,5 µL	1800 µL
5	7,2 cm <sup>2</sup>	30 µL	2370 µL	2400

#### 4. ERITROFAGOCITOZA IN BARVANJE

Pripravimo 3 ploščice za fagocitozo. Eno bomo inkubirali v celičnem inkubatorju na 37 °C, eno v hladilniku na 4 °C in eno na sobni T. Inkubacija v hladilniku služi kot kontrola, saj pri tej temperaturi do fagocitoze ne pride lahko pa pride do adhezije eritrocitov na monocite. Pripravimo tudi eno ploščico kjer bomo dodali neopsonizirane eritrocite (ali RhD neg ali dejansko neopsonizirane) in jo inkubiramo v celičnem inkubatorju.

1. Odstranimo medij za fagocitozo in dodamo 600 µL **1,25 % v/v** mešanice opsoniziranih eritrocitov.
2. Inkubiramo **1 uro** na 37°C.
3. Odlijemo medij, odstranimo pregrade med komorami po navodilih proizvajalca
4. V čašo nalijemo 100 mL PBS in vanj potopimo ploščico, da speremo nefagocitirane eritrocite. Ploščico 30-40 x nežno stresemo, odstranimo iz čaše in popivnomo na brisački ter popolnoma posušimo na zraku (20 min).
5. Wright-giemsa barvanje: stekelce potopimo (2 mL) v barvilo za 1 min. Po 1 minuti dodamo 2 mL DPBS (enak V kot WG barvila). **Nežno!!!!** dobro premešamo s pihanjem.
7. Po 2 minutah dobro speremo z dH<sub>2</sub>O in posušimo na zraku.
8. Ni nujno potrebno, samo posušen preparat je ok in ga lahko shranjujemo v hladilniku. Na stekelce kapni kapljico 100 % glicerola, pokrij s krovnim steklcem in zatesni s prozornim lakom za nohte.

9. Preštejemo celice: a) Neobarvane – s fazno kontrastnim mikroskopom pod 40X povečavo.

b) Obarvane – s svetlobnim mikroskopom pod 1000X povečavo.

Preštejemo od 200-600 monocitov ter število fagocitiranih eritrocitov. Števila prešteti enot uporabimo v izračunu povprečnega fagocitotskega indexa (FI).

$$FI = (\text{št. fagocitiranih eri} / \text{št. Monocitov}) \times 100 \quad [\%]$$

## PONAVLJANJE

Na kašen način bi še lahko spremljali fagocitozo?

Zakaj smo uporabljali RhD pozitivne eritrocite?

Kakšen je klinični pomen fagocitoznega indeksa višjega od 40 %?

## 14 Vaja 8: Priprava trombocitnega gela

### S trombociti bogata plazma

S trombociti bogata plazma (angl. PRP – »Platelet Rich Plasma«) je plazma z visoko koncentracijo trombocitov. Ob aktivaciji trombocitov se tvori t. i. trombocitni gel, sestavljen iz fibrina in vanj ujetih celic, ki ga lahko naneseemo na poškodovano mesto. Iz granul aktiviranih trombocitov se ob aktivaciji sprostijo rastni dejavniki in dejavniki strjevanja krvi, ki pospešijo celjenje rane. Trombocitni gel zaradi teh učinkovin lahko uporabljamo za pospeševanje celjenja kroničnih ran, kosti, vezi in ligamentov ter zaraščanje ran v estetski, kardiovaskularni, oralni in maksilofacialni kirurgiji.

### Struktura trombocitov in njihova fiziološka vloga

Trombociti so brezjedrni celični delci, ki nastajajo v kostnem mozgu v procesu celične fragmentacije iz megakariocitov. V periferni krvi zdravega posameznika je  $150\text{--}350 \times 10^9/\text{L}$  trombocitov, njihova življenjska doba je 7–9 dni. Po krvi krožijo v mirujoči, neaktivirani obliki. Ob aktivaciji, ki jo sproži stik s poškodovanim endotelijem ali različni fiziološki agonisti (npr. trombin), trombociti zaradi reorganizacije citoskeleta spremenijo obliko ter sprostijo vsebino granul v okolico. To sproži kaskado koagulacije oz. strjevanja krvi. Po aktivaciji se trombociti tudi zlepijo (agregirajo), na njihovi površini pa se izpostavijo nekatere znotrajcelične molekule, ki lahko služijo kot označevalci aktiviranih trombocitov, npr. CD62 ali P-selektin.



**Slika 38:** Trombociti v mirovanju (A) in aktivirani trombociti, ki sproščajo razne rastne dejavnike (B).

Poleg vloge pri hemostazi so trombociti oz. biološko aktivne snovi, ki jih vsebujejo, pomembne tudi pri imunskem odzivu in pri celjenju ran. V zadnjem času ugotavljajo, da so sposobni prenašati določene dele tumorjev in so udeleženi pri nastanku metastaz.

### Biološko aktivne snovi v trombocitih

Trombociti vsebujejo mnogo beljakovin (citoskeletne, signalne, membranske, rastne dejavnike...), katerih večina se nahaja v  $\alpha$ -granulah. Med njimi so zelo pomembni rastni dejavniki, ki sprožijo in uravnavajo celjenje ran, koagulacijske beljakovine, citokini, integrini, vnetne molekule idr. Skupaj je v trombocitih več kot 300 različnih beljakovin in več kot 60 biološko aktivnih, ki so vključene v vse faze celjenja ran, kot so kemotaksa, celična



proliferacija in diferenciacija, angiogeneza, odlaganje ekstracelularnega matriksa, uravnavanje imunskega odziva, protimikrobna aktivnost in remodeliranje tkiva.

## Terapevtski produkti iz trombocitov

V transfuzijski medicini se pripravki trombocitov uporabljajo za zdravljenje trombocitopenije in drugih trombocitnih motenj, trombocitne koncentrate pa uporabljamo tudi kot "dostavljalce" biološko aktivnih molekul na mesto poškodbe za pospeševanje celjenja ran.

Poznamo različne oblike trombocitnih koncentratov, pripravljenih iz polne krvi:

a) **s trombociti bogata in z levkociti osiromašena plazma** (TBP) je del plazemske frakcije krvi, v kateri je koncentracija trombocitov višja od normalne. Izraz TBP se v literaturi nanaša na avtologne pripravke, ki naj bi bili zaradi zmanjšane tveganja za nastanek protiteles proti trombocitom pri prejemniku oz. prenosa bolezni s krvjo varnejši od alogenskih pripravkov. Kljub temu tudi pri uporabi alogenske TBP niso opazili neželenih reakcij pri bolnikih, ki so jih zdravili s trombocitnimi geli, in tudi protitelesa proti trombocitom je pri prejemniku alogenskega pripravka niso razvila. Ob aktivaciji trombocitov v TBP se tvori **trombocitni gel**, iz trombocitov se sprostijo rastni dejavniki in dejavniki strjevanja krvi. Trombocitni gel lahko naneseemo na mesto poškodbe, katere zdravljenje želimo pospešiti.

b) **s trombociti in levkociti (L) bogata plazma** (L-TBP) vsebuje poleg visokih koncentracij trombocitov tudi veliko levkocitov. Ker imajo slednji pomembno vlogo pri prirojenem imunskem odzivu (sodelujejo pri uničevanju bakterij in odstranjevanju poškodovanega tkiva), ni presenetljivo, da L-TBP deluje protimikrobno, čeprav obstajajo o učinku L-TBP nasprotujoča si poročila. Ob aktivaciji L-TBP dobimo **trombocitno-levkocitni gel**.

c) **s trombociti osiromašena plazma**, iz katere se lahko pripravi **fibrinsko lepilo**, je stranski produkt priprave TBP, ki ga dobimo po centrifugiranju. Ker nima trombocitov in s tem niti v njih shranjenih biološko aktivnih molekul, je ta pripravek za pospeševanje celjenja ran manj ustrezen, uporabljajo ga za pospeševanje hemostaze, saj vsebuje dejavnike strjevanja krvi.

## Aktivacija trombocitov in nastanek trombocitnega gela

Ob dodatku določenih snovi (t.i. aktivatorjev ali agonistov) se trombociti v TBP aktivirajo, pri čemer agregirajo in izločajo snovi iz granul, pride tudi do cepitve plazemskega fibrinogena - nastane fibrin, ki polimerizira. Tako nastane krvni strdek (*in vivo*) oz. trombocitni gel (*in vitro*). Najpogosteje se za aktivacijo uporablja kombinacija trombina in kalcija, obstajajo pa tudi alternativne metode, npr. dodatek batroksobina, neposredna aplikacija na poškodovano tkivo, sunek električnega toka ter večkratno izmenično zamrzovanje in odtajevanje pripravka.

Po nastanku strdka začnejo aktivirani trombociti izločati že sintetizirane molekule v 10 minutah. 95 % jih izločijo v eni uri po nastanku strdka. Rastne dejavnike trombociti nato sintetizirajo in izločajo do konca svoje življenjske dobe.

### Uporaba trombocitnega gela

Prvi je o uporabi fibrinskih lepil za celjenje ran in pospeševanje zdravljenja poročal Matras leta 1970, Whitman s sodelavci pa je prvi poročal o uporabi trombocitnega gela v maksilofacialni in oralni kirurgiji leta 1997. Zdaj se trombocitni gel uporablja za obnavljanje mehkih tkiv in kosti, zdravljenje kroničnih ran, zmanjševanje postoperativnih infekcij, zmanjšanje krvavitev ter lajšanje bolečin. O kliničnih aplikacijah poročajo v perodontalni, maksilofacialni in oralni kirurgiji, pri srčnih obvodih in zdravljenju kroničnih kožnih razjed ter razjed mehkega tkiva.

### Priprava s trombociti bogate plazme za trombocitni gel na Zavodu za transfuzijsko medicino (ZTM)

TBP na ZTM pripravljamo po validiranem postopku iz *buffy coata*, ki ga dobimo pri predelavi polne krvi zdravih krvodajalcev. Darovalca levkocitne plasti izberemo tako, da je njegova kri ABO in RhD skladna s prejemnikovo.

Priprava TBP poteka v čistih proizvodnih prostorih Laboratorija za celično biologijo, v katerih so zagotovljene razmere, kot jih predpisujejo priporočila GMP («Good Manufacturing Practices»). »*Buffy coat*« iz odvzemne vrečke aseptično prenesemo v sterilno centrifugirko ter centrifugiramo. Supernatant prenesemo v svežo centrifugirko, del vzorca pa uporabimo za določitev končnega števila celic v pripravku ter mikrobiološko kontrolo končnega produkta.



**Slika 39:** Izhodiščni vzorec («buffy coat») pred centrifugiranjem (levo). »Buffy coat« po centrifugiranju (desno).

Če TBP ustreza vsem kazalcem kakovosti (primeren volumen, število celic), TBP izdamo (do izdaje TBP hranimo v temi na sobni temperaturi). Opravimo tudi mikrobiološko kontrolo končnega produkta.

## EKSPERIMENTALNO DELO

### Postopek priprave s trombociti bogate plazme:

- Vrečko z levkocitnim pripravkom odpri s pomočjo sterilnega skalpela.
- Vsebino vrečke z 10 mL pipeto prenesi v označeno centrifugirko (50 mL).
- Levkocitni pripravek centrifugiraj 8 min pri 1500 g (pospešek 8, pojemek 2). Po končanem centrifugiranju se v centrifugirki nahaja pelet iz eritrocitov ter supernatant, ki predstavlja TBP.
- TP z 10 mL pipeto prenesi v novo označeno 50 mL centrifugirko.
- V označeno centrifugirko (1,5 mL) prenesi 1 mL pripravka TBP.
- Vzorca v 1,5 mL centrifugirkah odnesi na hematološki analizator.
- S pomočjo križnega računa določi število trombocitov, eritrocitov ter limfocitov v pripravku:

število trombocitov v pripravku = (izmerjeno število trombocitov x volumen pripravka)/1000 mL

### Postopek priprave trombocitnega gela:

- Pripravimo raztopino trombina:
  - vialo s  $\text{CaCl}_2$  in liofiliziranim trombinom poškropi z razkužilom;
  - iz vialo s  $\text{CaCl}_2$  z iglo odvzami 5ml raztopine ter jo prenesi k liofiliziranemu trombinu;
  - vialo previdno mešaj toliko časa, da se trombin raztopi.
- V svežo siringo potegni v  $\text{CaCl}_2$  raztopljen trombin ter ga počasi in ob steni vbrizgaj v s trombociti bogato plazmo.
- Centrifugirko s TBP počasi mešaj.

## PONAVLJANJE

1. Kaj je s trombociti bogata plazma in za kaj se lahko uporablja?
2. Katere trombocitne koncentrate poznamo in kakšne so razlike med njimi?
3. Kako iz s trombociti bogate plazme pripravimo trombocitni gel?

## 15 Literatura

Barlič A., Božikov K. Matične celice iz maščobnega tkiva in njihova uporaba. *Farm Vestn* 2010; 61: 42-45.

Cirman, T., Cukjati, M., Domanovič, D., Rožman, P. Priprava trombocitne plazme za trombocitni gel. *Sodobni pristopi pri zdravljenju s krvjo, celicami in tkivi : zbornik z recenzijo*. Ljubljana, Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji, 2013, str. 81-86.

Domanovič, D., Sever, M., Vrtovec, B., Ležarič, L., Fettich, J., Černelč, P., Rožmen, P. Preparation of autologous CD34+ cells for intracoronary infusion to patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Bilten za transfuziologiju*, 2009, letn. 55, št. 1/2, str. 79-83.

Invitrogen. Flow Cytometry [citirano 31. 3. 2014]. Dostopno na svetovnem spletu: [http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro\\_Flow/player.html](http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html).

Jazbec K, Jež M, Smrekar B, Miceska S, Rožman JŽ, Švajger U, Završnik J, Malovrh T, Rožman P. Chimerism and gene therapy - Lessons learned from non-conditioned murine bone marrow transplantation models. *Eur J Haematol*. 2018 Apr;100(4):372-382. doi: 10.1111/ejh.13024.

Jazbec K. 2014. Serijska presaditev kostnega mozga pri neobsevanih miši BALB/c. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 85 str.

Jež, M., Veber, M., Rožmen, P. Pluripotentne matične celice v embrionalnem razvoju in pri odraslem. *Farmaceutski vestnik*, 2012, letn. 63, št. 5/6, str. 305-311.

Jež, M., Rožman, P., Ivanovic, Z., Bas, T. Concise review: the role of oxygen in hematopoietic stem cell physiology. 2015 Sep;230(9):1999-2005.

Justin, M., Jež, M., Miceska, S., Rožman, P., Jazbec., K. Spine as an additional source of murine bone marrow cells, poslano v objavo, 2018.

Klančar, Gašper. Primerjava metod izolacije mezenhimskih matičnih celic iz humanega kostnega mozga z imunomagnetno selekcijo in adherenco na plastiko : diplomsko delo = (Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomski dela, 56). Ljubljana: [G. Klančar], 2011.

Krašna M., Maličev E., Rožman JŽ, Vrtovec B. Assessment of stability of CD34+ cell products enriched by immunoselection from peripheral blood mononuclear cells during refrigerated storage. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association*, Aug. 2017, vol. 56, no. 4, str. 566-570

Krečič Stres, H., Krkovič, M., Koder, J., Maličev, E., Drobnič, M., Marolt, D., Kregar-Velikonja, N. Mesenchymal stem cells : a modern approach to treat long bones defects. 11th Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing 2007 : MEDICON 2007, 26-30 June, 2007, Ljubljana, Slovenia. New York: Springer: International Federation for Medical and Biological Engineering, 2007, str. 253-256.

Lendeckel S., Jödicke A., Christophis P., Heidinger K., Wolff J., Fraser J.K., Hedrick M.H., Berthold L., Howaldt H.P. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg*. 2004;32(6):370-3.

Lužnik Z., Hawlina M., Bertolin M., Maličev E., Cirman T., Kopitar A.N., Ihan A., Ferrari S., Schollmayer P. Ex vivo cultivation of limbal epithelial stem/progenitor cells : comparison of two

culturing techniques. *European journal of ophthalmology*, ISSN 1120-6721, 2017, vol. 27, iss. 1, str. 1-5.

Maličev Elvira in Krašna Metka. Opredelitev krvotvornih matičnih in predniških celic v pripravkih za presaditev = Characterisation of haematopoietic stem and progenitor cells in products intended for transplantation. *Zdravniški vestnik 2018*; vol. 87, no. 1/2, str. 58-68

Maličev, E., Veber, M., Rožman, P. Izolacija in karakterizacija matičnih celic s pretočno citometrijo. Matične celice v reproduktivni medicini: od gametogeneze in vitro do nastanka raka: znanstveno srečanje : zbornik, Ljubljana, 2011, str. 87-94.

Potočar, Urška. Vpliv zamrzovanja na sposobnost proliferacije in diferenciacije matičnih celic iz maščobnega tkiva : diplomsko delo (Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomaska dela, 32). Ljubljana, 2010.

Rožman, P., Domanovič, D., Kneževič, M. Shranjevanje matičnih celic iz popkovnične krvi - danes in jutri. *Zdravniški vestnik*, 2012, letn. 81, št. 1, str. 44-53.

Šimc, M., Strbad, M., Jež, M., Rožmen, P. Zdravljenje z matičnimi celicami. *Zdravniški vestnik*, 2012, letn. 81, št. 9, str. 634-644.

Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-28.