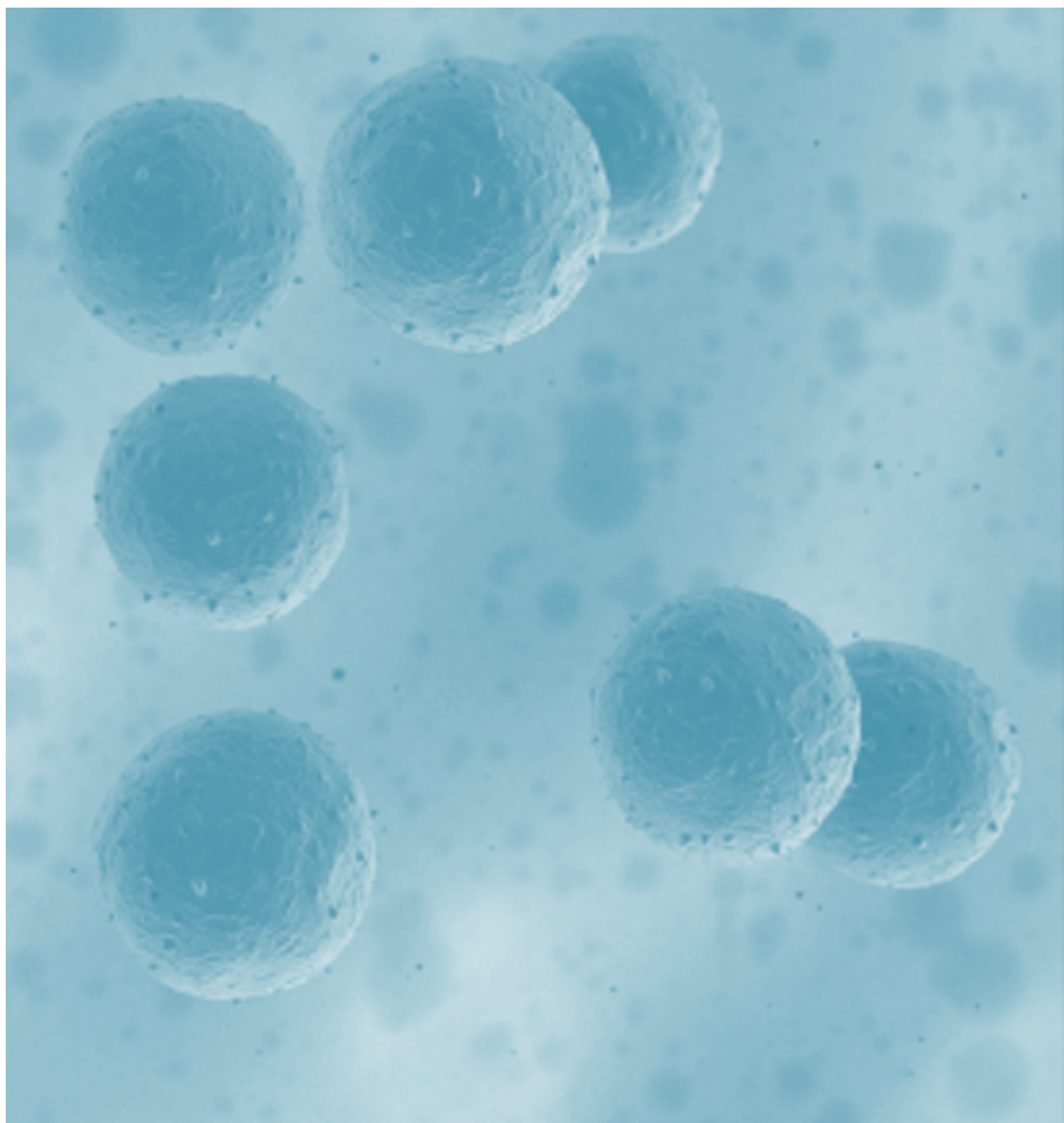


TERAPEVTSKA BIOTEHNOLOGIJA

Učbenik za vaje



Elvira Maličev
Mojca Jež

Naslov: **Terapevtska biotehnologija – učbenik za vaje**

Avtorji: doc.dr. Elvira Maličev, univ.dipl.biol.; dr. Mojca Jež, univ.dipl.bth.

Recenzenti: doc.dr. Helena Lenasi, dr.med.; Matjaž Urbajs, dr. med.

Izdal in založil: Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino
Šljajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

Tisk: Infokart
junij 2014

Naklada: 50

ISBN: 978-961-6596-16-9

TERAPEVTSKA BIOTEHNOLOGIJA

Učbenik za vaje

Elvira Maličev
Mojca Jež

KAZALO

UVOD	5
Napredna zdravljenja	5
Matične celice	5
Krvotvorne matične celice	8
Mezenhimske matične celice	10
Pluripotentne matične celice	11
Postopki za dokazovanje pluripotentnosti	14
Diferenciacija matičnih celic <i>in vitro</i>	15
Diferenciacija krvotvornih in mezenhimskih matičnih celic	16
Diferenciacija pluripotentnih matičnih celic	16
Tkivno inženirstvo	17
Primer tkivnega inženirstva: Kako sestaviti srce v laboratoriju	19
Laboratorij za celično biologijo	21
Osnovna oprema	21
Celične kulture	22
Gojilni medij in rastni pogoji	24
Vaja 1 in 2: Postopki ločevanja in karakterizacije celic	26
Postopki ločevanja celic	26
Postopki karakterizacije celic	29
EKSPERIMENTALNO DELO	32
Gradientno centrifugiranje	32
Ločitev matičnih celic od linijsko diferenciranih celic z negativno selekcijo	33
Fluorescenčna mikroskopija in pretočna citometrija	35
Vaja 3: Postopki določanja števila in viabilnosti celic	37
Nekroza	37
Apoptoza	38
EKSPERIMENTALNO DELO	39
Štetje celic z uporabo hemocitometra	39
Štetje celic z uporabo avtomatskega števca »Vicell«	40
Štetje celic s pretočnim citometrom	40
Določanje števila mrtvih/apoptotičnih celic s pretočno citometrijo	43
Vaja 4: Izolacija matičnih celic iz maščobnega tkiva	48
Maščobno tkivo	48
Matične celice iz maščobnega tkiva (ASC)	48
Klinična uporaba matičnih celic iz maščobnega tkiva danes in v prihodnosti	49
EKSPERIMENTALNO DELO	51
Izolacija matičnih celic iz maščobnega tkiva	51
Diferenciacija matičnih celic iz maščobe v adipocite	53
Diferenciacija matičnih celic iz maščobe v kostne celice	54
Vaja 5: Priprava trombocitnega gela	58
Trombociti in njihova uporaba	58
Terapevtski produkti iz trombocitov	59
EKSPERIMENTALNO DELO	62
Priprava trombocitnega gela	62
Literatura	65

UVOD

Napredna zdravljenja

Vse nove terapije, ki vključujejo zdravljenje s celicami, tkivno inženirstvo ali gensko terapijo, imenujemo **napredna zdravljenja**. **Celična terapija** predstavlja zdravljenje s presaditvijo različnih vrst celic. Pri tem uporabimo usmerjene ali zrele celice ali pa matične celice, ki jih usmerimo v razvoj v različne končno diferencirane celične vrste, s katerimi popravimo okvarjeno ali manjkajoče tkivo. Pri **tkivnem inženirstvu** gre za uporabo celic, biokemičnih dejavnikov, naravnih ali umetnih nosilnih materialov in inženirskih metod za izboljšanje biološke funkcije poškodovanega tkiva oz. organa. Pojem **regenerativna medicina** se mnogokrat uporablja kot njegov sinonim, vendar je pri regenerativni medicini več poudarka na uporabi matičnih celic. **Genska terapija** je znotrajcelični 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. Tradicionalni načini zdravljenja poškodb temeljijo na uporabi umetnih materialov, ki sicer nadomestijo poškodovano tkivo, vendar nikoli ne postanejo funkcionalno tkivo, zaradi česar pogosto trpi kakovost bolnikovega življenja.

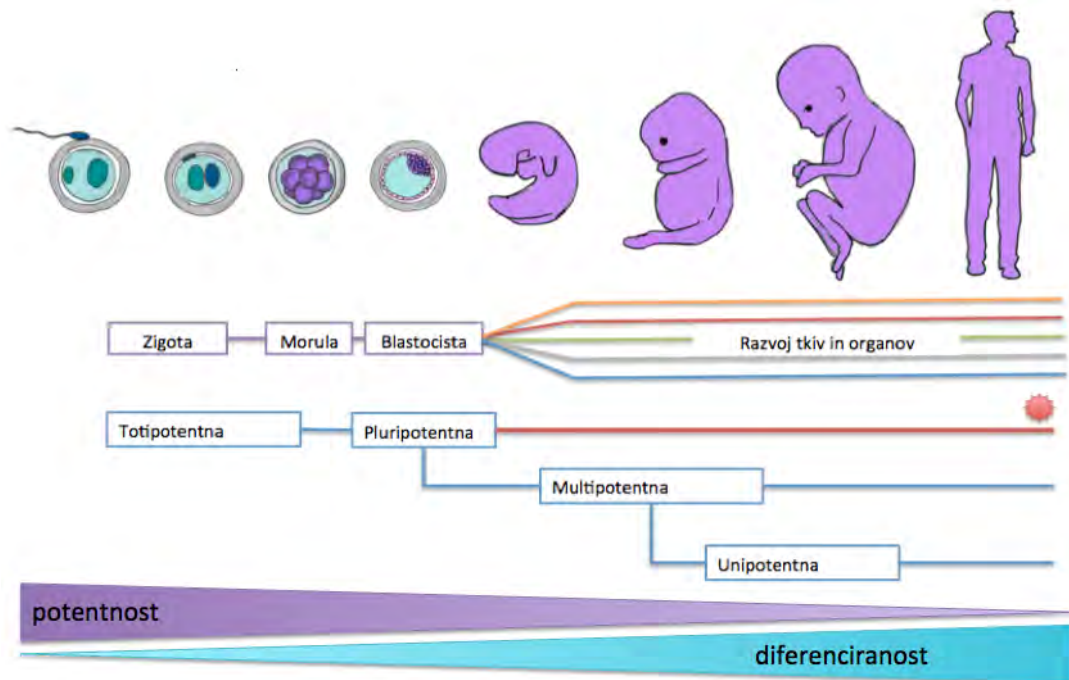
Pri vseh treh oblikah naprednega zdravljenja se najpogosteje poslužujemo različnih matičnih celic. Matične celice lahko v laboratoriju z uporabo različnih snovi razvijemo v različne vrste specializiranih celic. Teoretično lahko s kombinacijo različnih vrst celic in uporabo tridimenzionalnih nosilcev 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 vzgajali in presadili preproste votle organe (sapnik in mehur). Vzgajanje bolj zapletenih organov, kot so ledvice ali pljuča, pa pomeni, da mora na pravih mestih biti več deset različnih vrst celic, hkrati pa moramo vzgajati tudi vsestransko mrežo krvnih žil, ki celice preskrbujejo s kisikom in hranili kar zaenkrat v praksi še ni izvedljivo.

Matične celice

Matične celice so maloštevilčna populacija nespecializiranih celic, ki jih najdemo v tkivih zarodka in odraslega organizma. So nediferencirane, po obliki podobne limfocitom in sposobne 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 matičnih celic se spreminjajo tako

njihova oblika in velikost kot tudi izraženost različnih antigenov na njihovi površini in v notranjosti. Z identifikacijo teh antigenov, oziroma celičnih označevalcev, ugotavljamo prisotnost oziroma številčnost matičnih celic 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: V različnih razvojnih stopnjah v razvoju osebkca se nahajajo matične celice z različnim razvojnim potencialom. Po trenutno prevladujoči teoriji se s staranjem osebkca zmanjšuje potentnost matičnih celic. Novejša dognanja namigujejo, da se tudi v odraslem človeku nahajajo matične celice z razširjenim razvojnim potencialom (rdeča črta, označena z zvezdico).

Matične celice iz odraslega organizma predstavljajo perspektivno 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 pri zdravljenju.

Glede na njihov izvor lahko matične celice razdelimo na embrionalne, fetalne in matične celice odraslega. Embrionalne izvirajo iz zgodnjih faz 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: Matične celice imajo lahko različno stopnjo potentnosti.

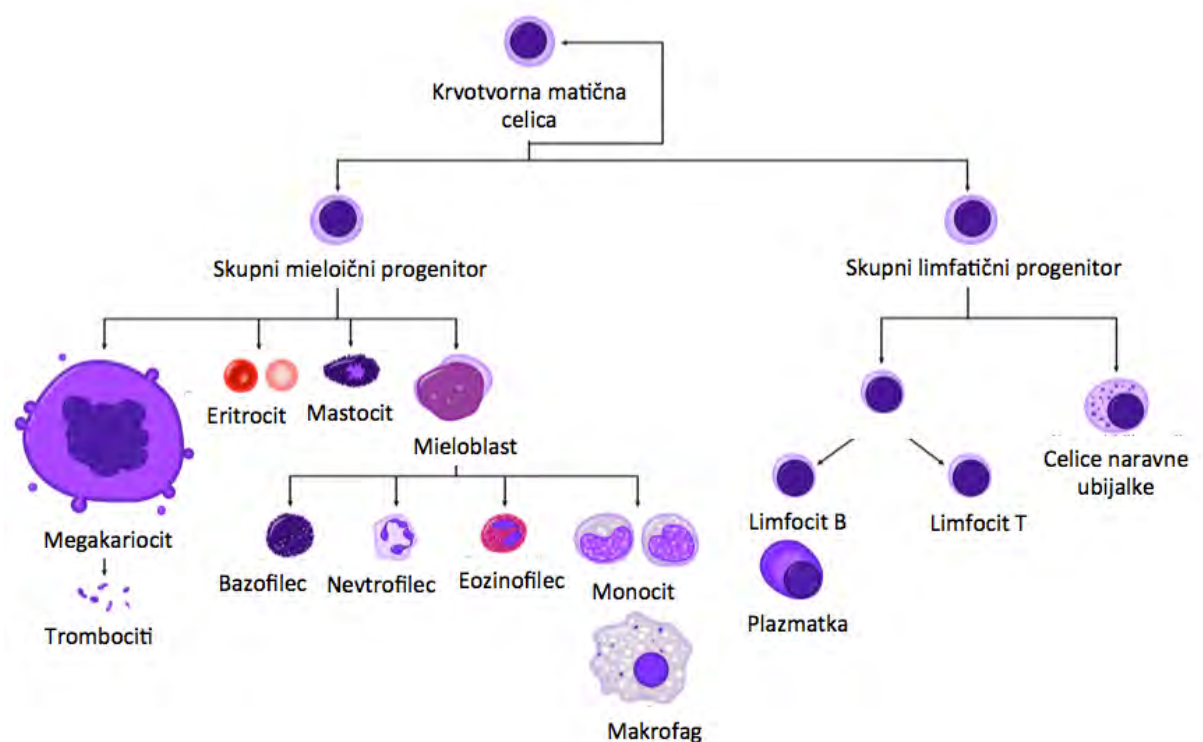
Matične celice	Lastnosti	Lokacija v tkivu
Totipotentne matične celice	Totipotentna je celica, ki je sposobna tvoriti celoten organizem, vključno z ekstraembrionalnim tkivom (trofoblast). Po nastanku blastociste pride do prve diferenciacije celic in do izgube totipotentnosti.	Zigota in zgodnje blastomere dokler zarodek ne doseže stopnje blastociste.
Pluripotentne matične celice	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, SSEA-4, 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 telomeraze, encima, ki podaljšujejo telomere kromosomov in s tem ohranjajo pluripotentnost tudi po delitvi celic.	Embrionalne matične celice izolirane iz notranje celične mase.
Multipotentne matične celice	Multipotentna matična celica je celica z manjšo potentnostjo in sposobnostjo diferenciacije v primerjavi s pluripotentno in totipotentno matično celico. Multipotentna celica lahko tvori različne vrste celic, ki pa vsi pripadajo istemu kličnemu listu.	Tkivno specifične matične celice, na primer hematopoetske in mezenhimske matične celice.
Unipotentne matične celice	Unipotentne so tkivno specifične celice in se lahko razvijejo v samo eno celično linijo. Imajo pa sposobnost samoobnavljanja in le-ta jih loči od somatskih celic.	Progenitorske 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 izkrvavitve, ker sevanje uniči trombocitne, eritrocitne in levkocitne progenitorje in se zato krvotvorni sistem ne more obnavljati. Logična ideja za zdravljenje je bila presaditev kostnega mozga. Obstoje 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 pa je šele razvoj novejših postopkov omogočil izolacijo krvotvornih matičnih celic. Danes vemo, da se različne vrste matičnih celic verjetno nahajajo v večini tkiv odraslega človeka.

Leta 1981 so Martin Evans, Matthew Kauffman in Gail Martin prvič uspešno izolirali notranjo celično maso iz mišjih zarodkov na stopnji blastociste ter celice 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 Thompson z Univerze v Wisconsinu. Do izolacije humanih embrionalnih matičnih celic je preteklo toliko časa, ker so zanje potrebni drugačni pogoji gojenja, omejen je dostop do zgodnjih humanih zarodkov, pojavljajo pa se tudi etični zadržki.

Krvotvorne matične celice

Najstarejša in najbolj razširjena celična terapija je presaditev krvotvornih matičnih celic (KMC). Prvo presaditev sorodniških KMC za zdravljenje levkemije je opravil E. Donnall Thomas leta 1957 in za razvoj tega načina zdravljenja prejel tudi Nobelovo nagrado leta 1990. Danes je moč z rutinsko presaditvijo KMC zdraviti več kot 70 malignih in nemalignih bolezni. Uspešnost zdravljenja je pri bolnikih z optimalnimi pogoji dosegla več kot 90-odstotkov. Letno opravijo na svetu več kot 50.000 presaditev KMC.



Slika 2: Razvoj krvnih celic iz krvotvorne matične celice. Krvotvorna matična celica se lahko diferencira v mieloično in limfatično vrsto. S postopno diferenciacijo se preko različnih predniških celic razvijejo vse krvne celice.

Presaditev KMC je trenutno še vedno glavna terapevtska in pogosto edina možnost za ozdravitev pri različnih hematoloških boleznih.

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 mieloične vrste: monociti, makrofagi, nevtrofilci, bazofilci, eozinofilci, eritrociti in trombociti. 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 krvotvorne matične celice so značilni celični označevalci: **CD34**, **CD45**, CD7, CD47, CD50, CD55, CD58, CD59, CD90, CD117, CD124, CD133 in CD164. 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 prekurzorjih. Po splošnem prepričanju sta za določitev števila krvotvornih matičnih 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 periferni 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 moga. V primeru **alogenskih** 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 ali v krvni obtok 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).

Mezenhimske matične celice

Mezenhimske matične celice izražajo več kot 20 različnih celičnih označevalcev 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:

- a) mezenhimske matične celice morajo biti sposobne adherence na plastiko v standardnih pogojih gojenja v gojilnih posodah,
- b) 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 α ali CD19 in HLA-DR) in
- c) populacija mezenhimskih matičnih celic mora imeti sposobnost *in vitro* diferenciacije v kostne, maščobne in hrustančne celice.

Preglednica 2: Označevalci mezenhimskih matičnih celic.

POZITIVNI OZNAČEVALCI	NEGATIVNI OZNAČEVALCI
Stro-1, CD10, CD13, CD58, CD71, CD73, CD90 (Thy-1), CD105, CD140b, CD146, CD133, vimentin	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
Adhezijske molekule: CD29 (β -integrin), CD44 (HCAM), CD49e ($\alpha 5$ -integrin), CD54 (ICAM-1), CD106 (VCAM-1), CD166 (ALCAM)	
Odvisno od vira celic in pogojev gojenja <i>in vitro</i> : CD349 (frizzled-9), SSEA-4, Oct4, nestin	

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 ali celični ločevalec.

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 in njihova vloga.

Površinski označevalec	Funkcija
SSEA-4	Gen <i>SSEA-4</i> je eden od označevalcev pluripotentnosti. Zapisuje 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.

Tra-1-60	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.
Tra-1-81	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 SSEA-3 in SSEA-4 je to značilen antigen za humane embrionalne matične celice.
Transkripcijski dejavnik	Iz osrednje regulatorne mreže, ki vzdržuje pluripotentnost.
Oct-4	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.
Sox-2	<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 <i>SOX</i> 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 <i>SOX</i> .
Nanog	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.
c-kit	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 (ang. 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 potrebno za zdravljenje. Vendar pa imajo tudi nekaj ključnih slabosti, zaradi katerih še niso v klinični uporabi. Ker jih pridobimo iz zgodnjih zarodkov, so torej pacientu tuje (alogene), 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 kože v celice iPS. 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 vnosa tujega tkiva in preprečimo možnost zavrnitve, še vedno pa so te celice pluripotentne, ter lahko po presaditvi tvorijo tumorje.

Največja ovira po presaditvi EMC je kot rečeno nepredvidljivo obnašanje celic. Težko se je zanašati na celične odgovore in reakcije, ki jih opazuješ v laboratoriju in predvidevati, kakšni bodo celični odgovori, ko celice presadiš v telo. Posebno z matičnimi celicami se borimo na dveh nasprotujočih si frontah: po eni strani želimo, da bi se razvile v celično vrsto, ki jo potrebujemo, po 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 so tri podjetja (dve v ZDA, eno na Japonskem) pridobila 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.

Postopki za dokazovanje pluripotentnosti

Pluripotentnost (matičnost) določene celice lahko dokažemo na več načinov, to je z različnimi metodologijami. Načeloma je potrebno za natančnejšo opredelitev vsake preiskovane celice izpeljati pet postopkov (preglednica 4). Šele rezultati različnih postopkov nam dajo natančen vpogled v lastnosti proučevane celične populacije.

Preglednica 4: Metode za določanje pluripotentnosti.

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 vrste, ki pripadajo vsem trem kličnim listom (ekto-, endo-, mezoderm). Tvorba embrioidnih teles.	Prikazuje širok diferenciacijski 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	Teratomi so tumorji, ki jih tvorijo pluripotentne matične celice. Intrablastocistna injekcija in dopolnitev tetraploidne blastociste sta najstrožja testa pluripotentnosti. Zaradi etičnih zadžkov nista izvedljiva na humanih celicah.

Prvi oziroma osnovni postopek je analiza morfoloških značilnosti, 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, zato jih ne moremo določiti le na osnovi morfoloških značilnosti. 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 s postopki, kot so imunocitokemično barvanje, prenos western (ang. Western blot), pretočna citometrija in druge. Četrty način je funkcionalni dokaz pluripotentnosti *in vitro*, ki ga ponavadi izvedemo z usmerjeno diferenciacijo preiskovanih matičnih celic v kulturi *in vitro* v celične vrste, ki predstavljajo vse tri klične liste, to je v endoderm (npr. beta celice pankreasa, hepatocite, itd.), 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 vbrizganju preiskovanih celic v miške SCID, tvorba tkiv vseh treh kličnih listov po vbrizganju preiskovanih celic v živalsko blastocisto).

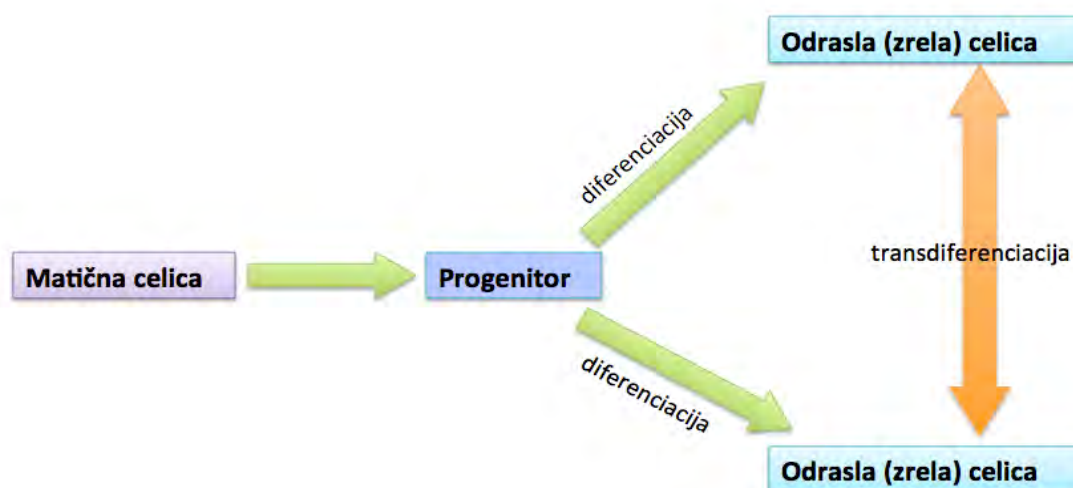
Poleg osnovnih petih metod obstaja še nekaj dodatnih, npr. analiza aktivnosti encima alkalne fosfataze, analiza aktivnosti encima telomeraze, analiza kariotipa, analiza celičnega cikla, analiza epigenetskega profila celic ter druge.

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 tudi v odraslem organizmu, kjer se odrasle 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. Medtem ko so embrionalne matične celice pluripotentne in se lahko razvijejo v katero koli celico v organizmu, so odrasle matične celice 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 3: Diferenciacija poteka preko progenitorskih celic do končno specializiranih odraslih celic. Transdiferenciacija je proces, pri katerem se tkivne matične celice iz enega tkiva odraslega spremenijo v specializirane celice drugega tkiva. Mehanizem še ni popolnoma pojasnjen.

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

- z dodajanjem ali odstranjevanjem topnih sestavin v gojilnem mediju – rastnih dejavnikov (EGF, KGF, TGF- β , FGF, HGF, ...), citokinov (interlevkini, onkostatina-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.

Diferenciacija krvotvornih in mezenhimskih matičnih celic

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, verjetno pa tudi druge.

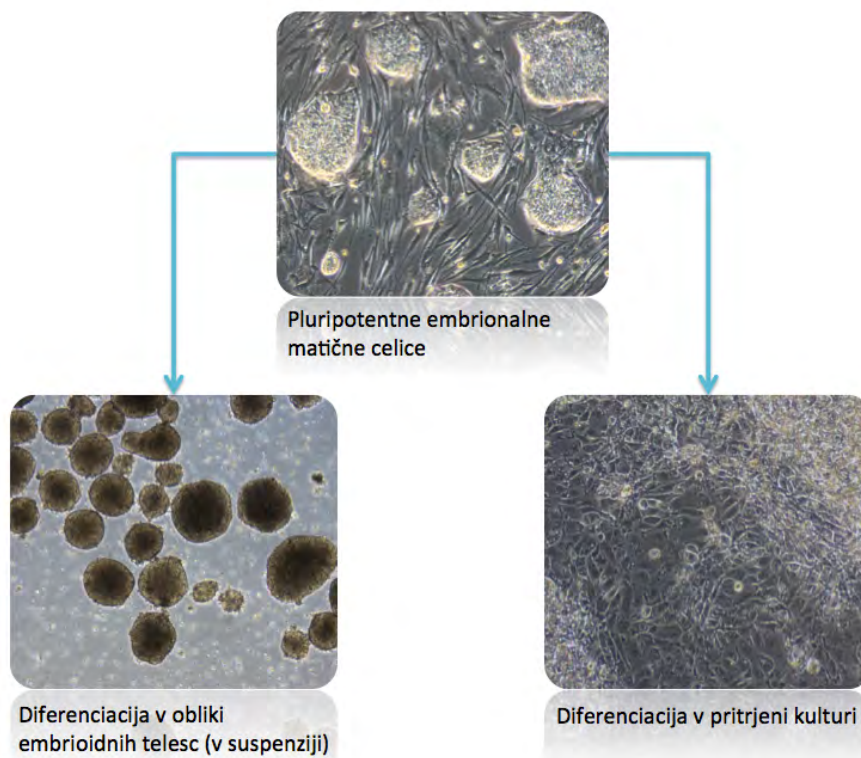
Krvotvorne matične celice so tiste, ki se v postopku diferenciacije razvijejo v vse vrste krvnih celic in pripomorejo k vzdrževanju števila in razmerja celic v periferni krvi. Mezenhimske matične celice so mešana populacija celic, ki se lahko razvijejo v celice kosti, hrustanca, maščobnega ali vezivnega tkiva. Endotelijske progenitorske celice so tiste, ki se v postopku angiogeneze razvijejo v žile in kapilare.

V kostnem mozgu po nekaterih raziskavah najdemo tudi embrionalnim matičnim celicam podobne celice.

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.

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 pritrdjevanja 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 pritrdjanje.



Slika 4: Diferenciacija embrionalnih matičnih celic lahko poteka v suspenziji v obliki embrioidnih telesc ali kot pritrjena kultura.

Tkivno inženirstvo

Napredna zdravljenja so 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) oziroma posamezne biomolekule, ki vplivajo na migracijo, pomnoževanje, diferenciacijo celic in uporabimo posebne laboratorijske pristope, govorimo o **tkivnem inženirstvu**. Tako lahko razvijemo novo tkivo v laboratoriju ali v telesu.

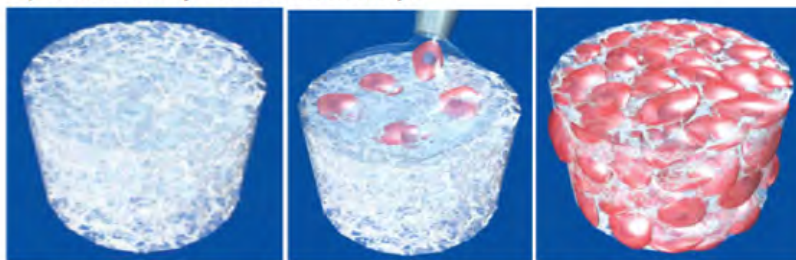
Izraz **tkivno inženirstvo** so znanstveniki začeli uporabljati ob koncu 80. let 20. stoletja, ko so v laboratorijih začeli vzgajati kožne nadomestke. Ta dosežek je pomenil revolucijo v medicini, saj je omogočil zdravljenje hudih opeklin in je reševal življenja. Kožni nadomestek sestavljajo keratinociti, ki so glavne celice povrhnjice kože in primeren nosilni material za celice. To je bil začetek tkivnega inženirstva.

Ključno vlogo pri tkivnem inženirstvu imajo nosilni materiali ali nosilci. Nosilci ustvarjajo ugodne pogoje za razvoj tkiva. Iskanje in razvoj ustreznega nosilca, ki bo podpiral razvoj

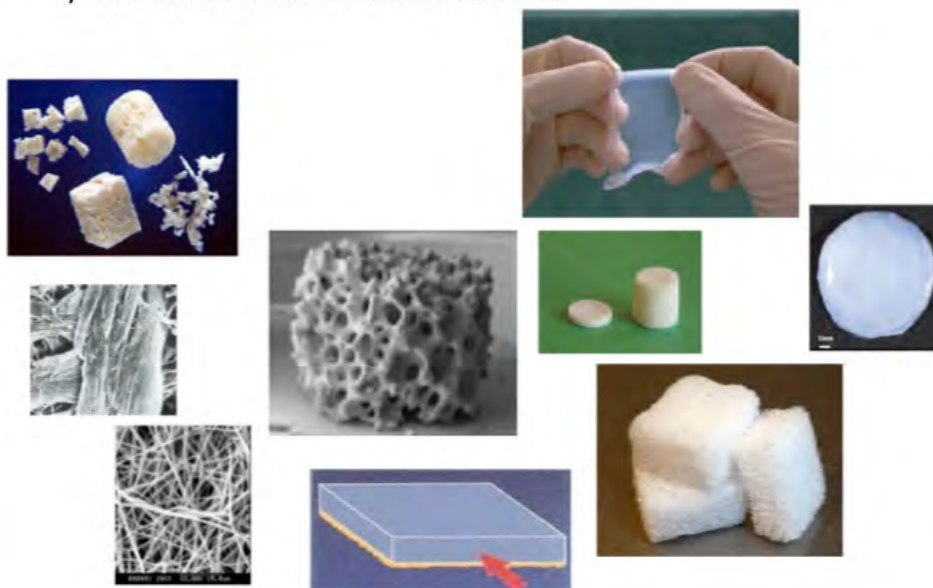
določenega tkiva predstavlja v tkivnem inženirstvu največji problem. Nosilci morajo namreč ustrezati številnim pogojem, kot so:

- 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 željeno obliko**.

A) Nosilci nudijo celicam 3D okolje.



B) Biomateriali so lahko naravni ali umetni.



Slika 5: Različne oblike nosilcev. Nosilci nudijo celicam ustrezno okolje. Kot biomateriali se uporabljajo različne naravne (svila, kolagen, alginat, apatit) in umetne snovi (keramika, različne kovine, polimeri).

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.

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). Pri zapletenejših organih pa se mora na pravih mestih nahajati več različnih vrst celic, hkrati pa moramo vzgojiti tudi kompleksno mrežo krvnih žil, ki celice preskrbujejo s kisikom in hranili. Ti organi morajo biti aseptični, sposobni rasti s človekom, 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). Samo v ZDA je na čakalni listi za presaditev srca 3500 bolnikov. Vzgoja srca v laboratoriju je zelo zahtevna. 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, celice 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 3D tiskalniki še ne morejo natisniti. Zato je trenutno vodilna uporaba ti. »decelulariziranega srca« – iz zunajceličnega 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 zunanjimi 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 rastnih dejavnikov VEGF, ki je ključen regulator neovaskularizacije, in bFGF, ki je pomemben pri pomnoževanju 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 pritrdijo nato sledi perfuzija gojilnega medija skozi srce. Ta postopek ni idealen, saj se vse celice ne pritrdijo in prihaja do izgub.

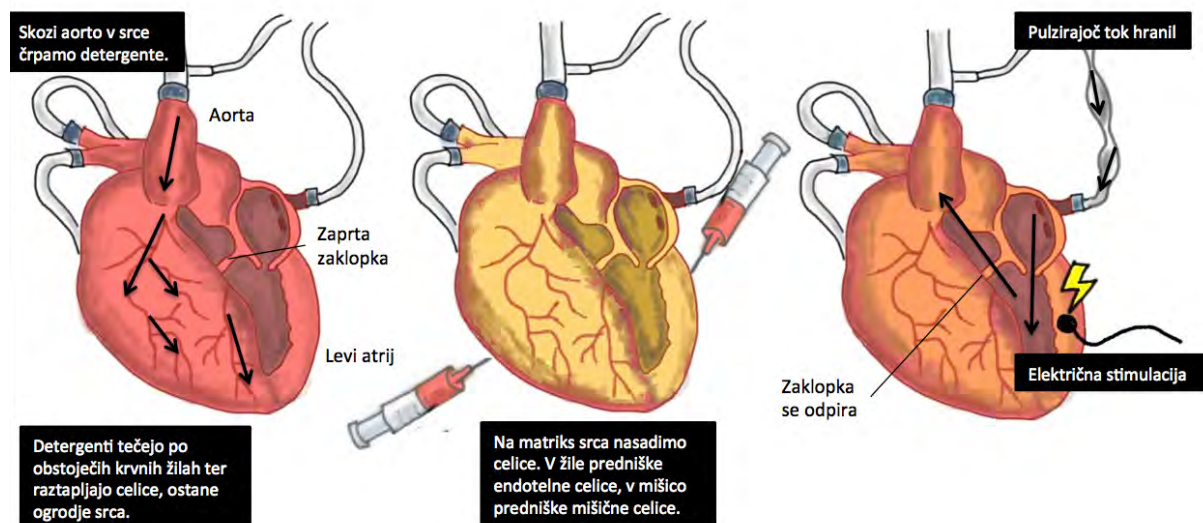
Celice se torej pritrdijo na nosilec, začno se deliti in diferencirati. Da celice postanejo funkcionalni kardiomiociti potrebujemo več kot le gojilni medij z rastnimi dejavniki. Zelo pomembno je namreč okolje, ki s svojo trdoto, obliko, mehanskim stresom in drugimi lastnostmi pomembno vpliva na celice 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 bolniku. Prva težava pri 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 6: V laboratoriju vzgojeno srce.

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.

Osnovna oprema

Brezprašna komora

Za vzdrževanje aseptičnih pogojev in ohranjanje “sterilnosti” (odsotnosti živih organizmov) materiala uporabljamo brezprašno komoro 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. V njem izvajamo manipulacije s celicami in tkivi, kot so menjava medija, presajanje celic in druge.

CO₂ inkubator

Danes so CO₂ 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 in pomnoževanje celic. Uravnavani parametri so: delni tlak CO₂, 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 CO₂ (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 posodah, njihovo opazovanje med gojenjem je mogoče s spodnje strani. Zato potrebujemo invertni mikroskop, kjer se objektivi nahajajo 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.

Celične kulture

Priprava celične kulture

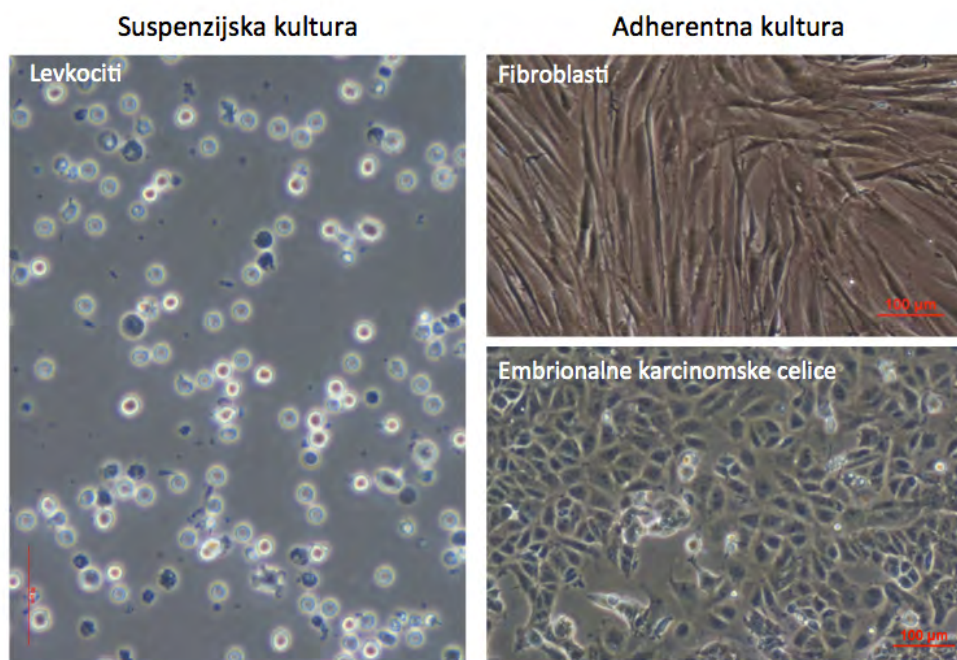
Ključni dejavniki pri rokovanju s celicami so izbira vira celic, njihova izolacija ali osamitev in priprava celične kulture. Tkiva in celice, ki nam služijo kot vir celic za celično kulturo, odvajamo v aseptičnih pogojih, vse stopnje predelave celic dokumentiramo. Zagotoviti moramo, da bo ravnanje s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

Osnovni obliki gojenja celic:

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.

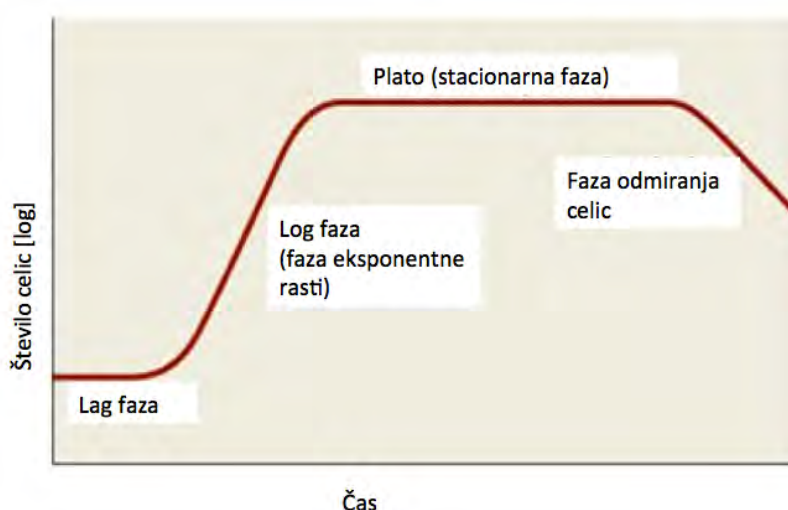
Koncentracijo celic izračunamo na volumsko enoto (ml gojišča). Gostoto pritrjenih celic v gojilni posodi izračunamo na površinsko enoto (cm²). Skušamo doseči, da celice vedno nasadimo pri isti gostoti in jih tudi gojimo do iste gostote. Gostota celic in intenzivnost stika med njimi namreč vplivata na 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 7: Suspensijska in adherentna celična kultura. Določene vrste celic se pri gojenju v laboratoriju pritrdijo na podlago (npr. kožne celice) medtem, ko druge (npr. krvne celice) ostanejo v suspenziji.

Senescenca ali biološko staranje je posledica določenega števila celičnih delitev. Po prevladujoči teoriji do senescence pride zaradi krajšanja telomer (koncev kromosomov). Pri vsaki celični delitvi se namreč izgubi del zaporedja, ki sestavlja telomere. Ko se te preveč skrajšajo, se celice prenehajo deliti ter kasneje odmrejo. Običajno se pri normalnih diploidnih celicah to *in vitro* zgodi po 50 podvojitvah.



Slika 8: 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.

Presajanje celic

Ko celice v kulturi dosežejo gostoto, ki zavira njihovo nadaljnjo rast oziroma pomnoževanje (ponavadi nekje pri 80 % preraščene površine gojilne posodice), moramo celice presaditi. Idealno je, če 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 posodice:

- **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,
- **proteolitični encimi** – tripsin, kolagenaza ali pronaza se navadno uporabljajo v kombinaciji z EDTA (ang. Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid). Encimi odlepijo celice s podlage. 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.
- **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) Ca^{2+} in Mg^{2+} ione. Ti ioni so potrebni za pritrdjanje celic na površino. Ker v kompleksu z EDTA niso več dostopni celici, se le ta odlepi. V poskusih, kjer potrebujemo takojšnje ponovno pritrdjanje 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.

Gojilni medij in rastni pogoji

Fiziološki parametri

- temperatura – sesalske celice 37 °C
- pH medija med 7.2 – 7.5
- vlažnost
- zračna faza – koncentracija CO_2 , ki se raztopi v mediju je odvisna od delnega tlaka CO_2 v zraku in temperature. V mediju se nahaja natrijev bikarbonat, ki skupaj z raztopljenim 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 izpostavljammo čim manj.

Sestava medija

- ioni: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} , HCO_3^- (bikarbonatni ion)
- elementi v sledovih: železo, cink, selen
- sladkorji: najpogosteje uporabljamo glukozo
- aminokisline: 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 (BSA), 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 2-3x tedensko.

Opazovanje rasti celične kulture ter viabilnosti celic

Celice lahko opazujemo v sami kulturi z invertnim mikroskopom. Celice v suspenziji so okrogle in simetrične, adherentne celice pa se pritrdijo na podlago in razpotegejo po njej. Viabilnost 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 preštajemo 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, mikrobiološke sterilnosti, prisotnosti mikoplazem ter bakterijskih endotoksinov. Prav tako med celotnim postopkom nadzorujemo kakovost uporabljenih materialov ter uporabljamo le validirano laboratorijsko opremo.

Vaja 1 in 2: Postopki ločevanja in karakterizacije celic

1. Postopki ločevanja celic

Pri uporabi naprednih načinov zdravljenja v obliki celičnih terapij, kot tudi pri bazičnih raziskavah točno določenih celičnih vrst, je ločevanje celic eden izmed prvih postopkov, s katerim smo soočeni. Pri uporabi celic v terapevtske namene je mnogokrat ključnega pomena, da zagotovimo presaditev točno določene populacije celic, s katero dosežemo kar najboljši terapevtski učinek. Enako je pri gojenju, karakterizaciji in preučevanju fiziologije določene celične vrste pomembno, da izoliramo dovolj čisto populacijo celic, tako da pri analizi ne zaznavamo signalov, ki so posledica kontaminacije z ostalimi vrstami celic. Lastnosti, na podlagi katerih večinoma ločujemo celice, so 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 biološko funkcijo. Postopki ločevanja celic se med seboj razlikujejo po hitrosti obdelave, izkoristka in čistosti izolirane populacije celic.

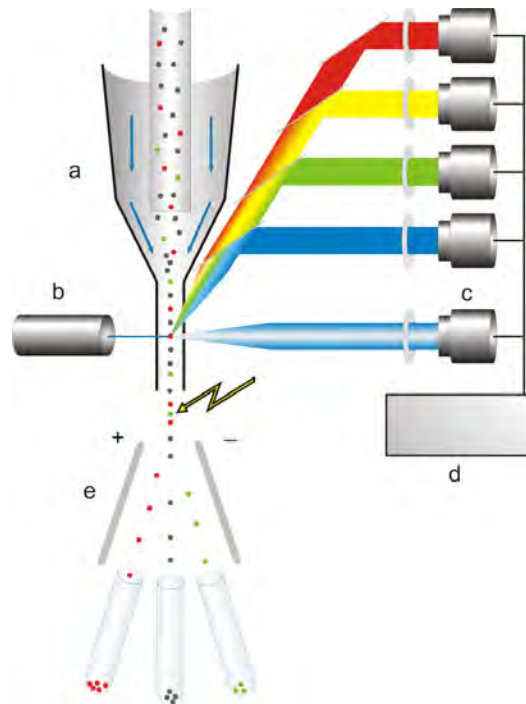
V prvo skupino, pri katerih ločevanje poteka glede na fizikalne lastnosti celic, uvrščamo postopke filtracije in gradientega centrifugiranja. Pri teh postopkih v kratkem času obdelamo veliko število celic in običajno služijo kot prva stopnja pri izolaciji celic. Z uporabo filtrov z določeno velikostjo 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.

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.

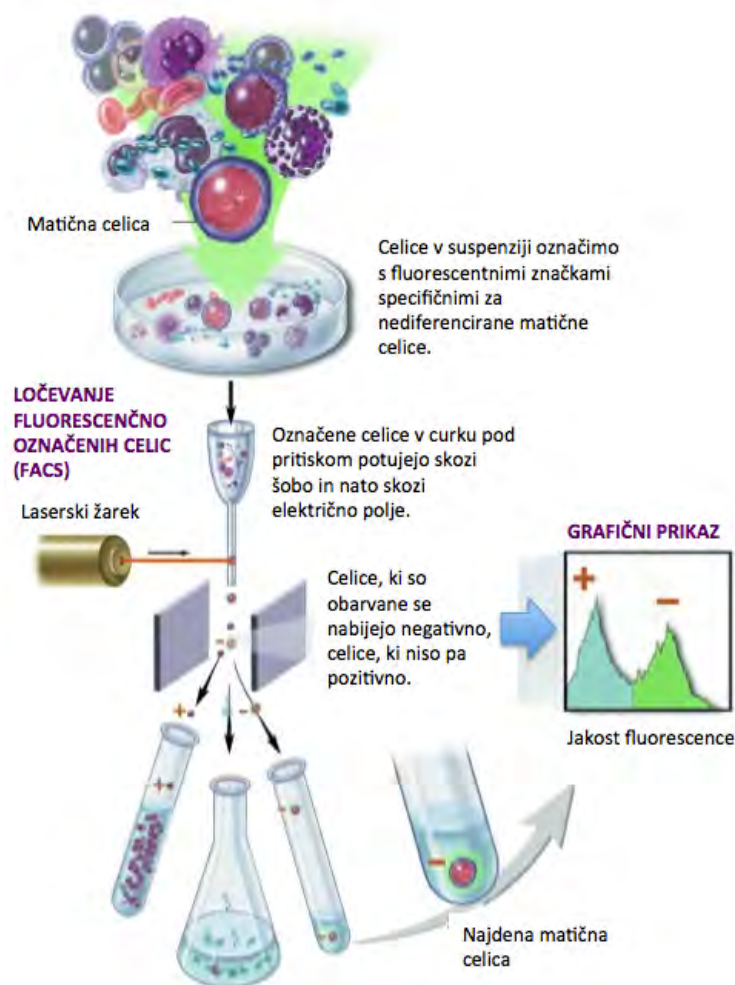
V primeru **pozitivne selekcije** iz populacije celic ločimo zgolj tiste celice, ki izražajo določen antigen. Pogosto pa se poslužujemo tudi **negativne selekcije ali deplecije**, pri kateri iz celične suspenzije odstranimo vse nezaželene vrste celic. Pri zahtevnejših izolacijah celic lahko uporabimo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



Slika 9: Osnovni deli celičnega ločevalnika: a) pretočna komora, kjer posamezne celice vstopajo v optični sistem; b) laser; c) detektor; d) računalnik; e) plošči z visoko napetostjo.



Slika 10: Ločevanje matičnih celic od ostalih celic v suspenziji s celičnim ločevalnikom.

Izolacija celic z vezavo na magnetne delce

Protitelesa lahko neposredno ali posredno vežemo na trdno matrico, kot so različni delci, vlakna ali kolone, kjer nato ločujemo celice. 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 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 biotinizirana protitelesa lahko uporabimo tudi magnetne delce, vezane na streptavidin, ki predstavlja le eno izmed ostalih možnosti posrednega načina vezav. Magnetni delci se razlikujejo tudi po

velikosti. Pri uporabi polistirenskih magnetnih delcev velikosti od 1 do 5 μm lahko celice ločujemo kar v centrifugirkah ali epruvetah. 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 karakterizacije 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 ugotavljamo 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 – titracije. Vsekakor je za pravilne rezultate nujno potrebna optimizacija postopkov označevanja 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-aktinomicin D) uporabljamo za detekcijo DNA ali RNA.

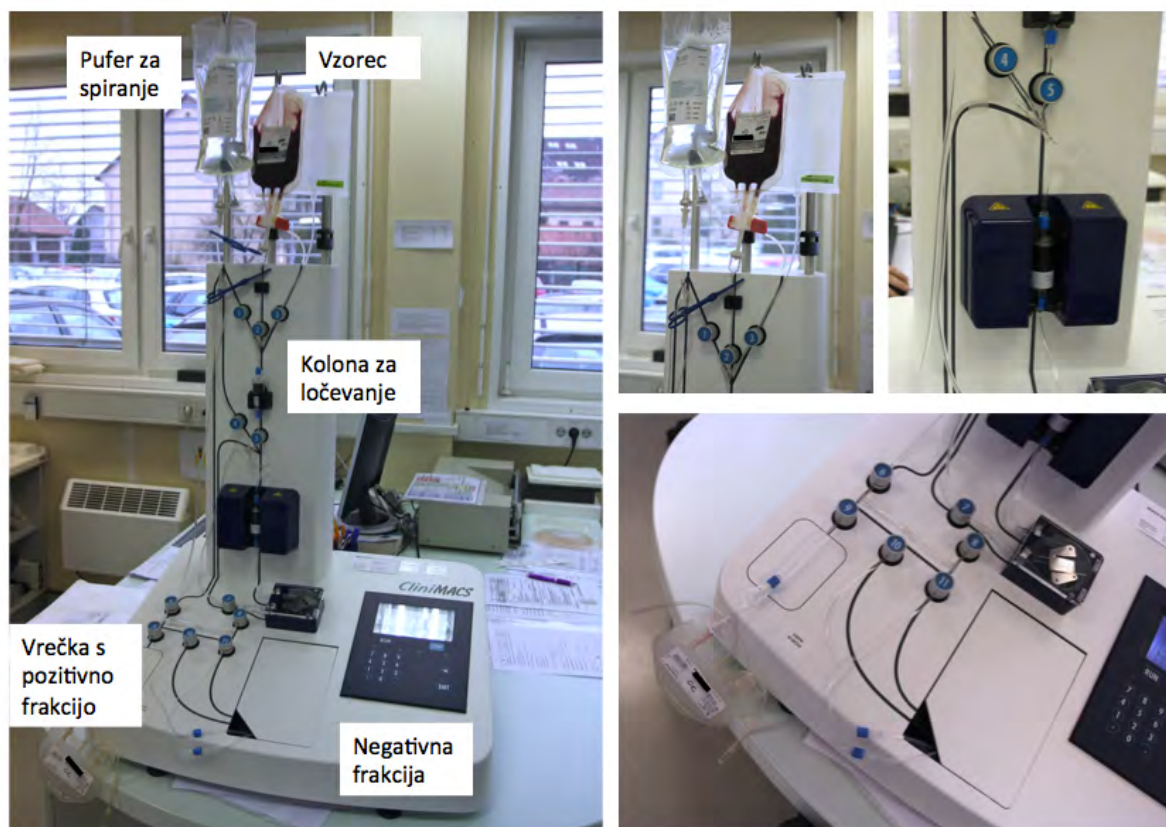
PRIMER: Zdravljenje s krvotvornimi matičnimi CD34+ celicami, pridobljenimi s pozitivno selekcijo

Izolacija obogatene populacije krvotvornih matičnih celic običajno poteka s pozitivno imunomagneto 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.

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

Pri avtomatskem šteju celic v pripravku se zaradi podobne morfologije CD34+ matične celice štejejo med levkocite.

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

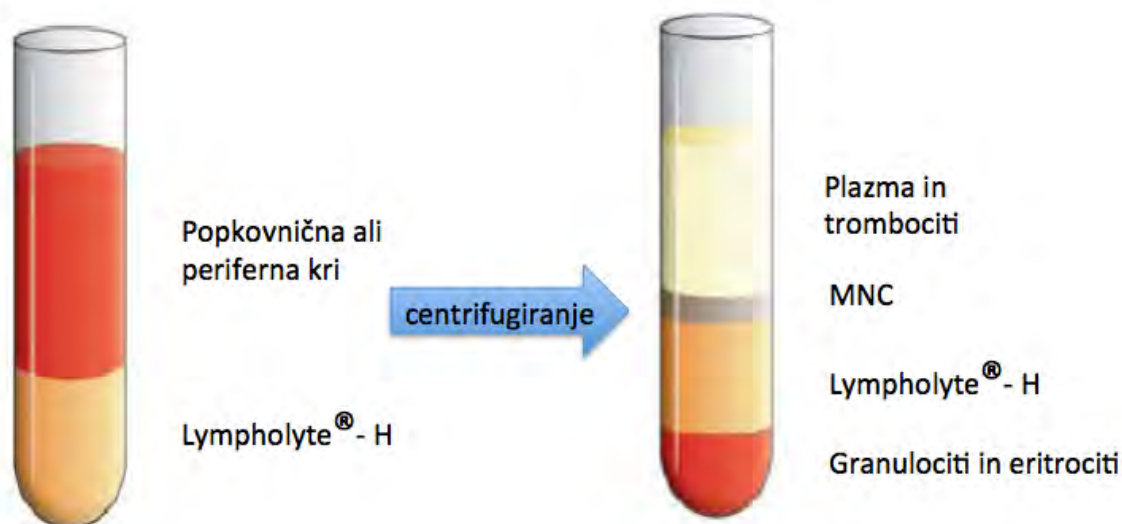


Slika 11: Naprava za imunomagnetno ločevanje celic na Zavodu republike Slovenije za transfuzijsko medicino omogoča aseptično ločevanje celic namenjenih za presaditev od ostalih celic v suspenziji.

EKSPERIMENTALNO DELO

1. Gradientno centrifugiranje

Enojedrne celice (MNC, ang. MonoNuclear Cells) 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 nanesemo 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 12: Izolacija MNC z gradientnim centrifugiranjem. S tem postopkom se celične populacije med centrifugiranjem zbirajo v ločenih plasteh.

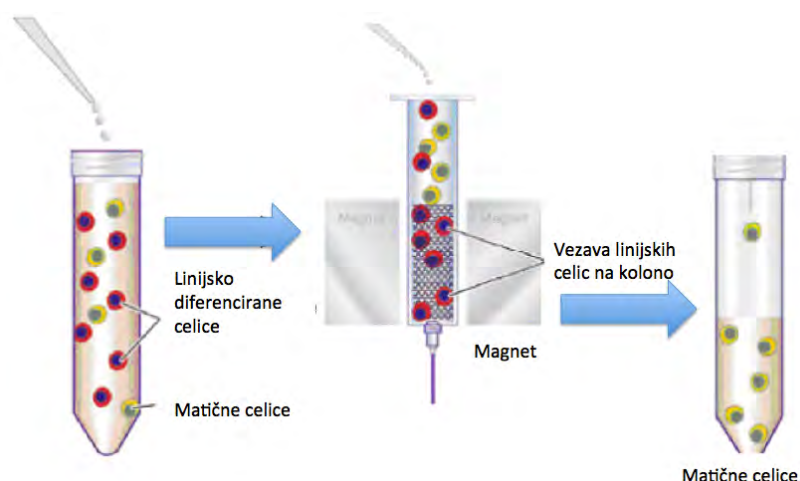
Postopek ločevanja celic iz krvi z gradientnim centrifugiranjem

- Vzorec krvi najprej razredči v razmerju 1:1 z D-PBS pufrom brez Ca^{2+} in 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 pufer 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 pufru za spiranje (2 mM EDTA in 0,5% BSA v pufru D-PBS).

2. Ločitev matičnih celic od linijsko diferenciranih celic z negativno selekcijo

Izolirane MNC vsebujejo mešanico različnih linijsko usmerjenih celičnih vrst (limfocite, monocite, itd.) ter zelo majhen odstotek matičnih celic (mezenhimske matične celice, krvotvorne matične celice, itd.). 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 13: 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.

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, neutrofilci
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

Postopek ločevanja celic z imunomagnetno selekcijo

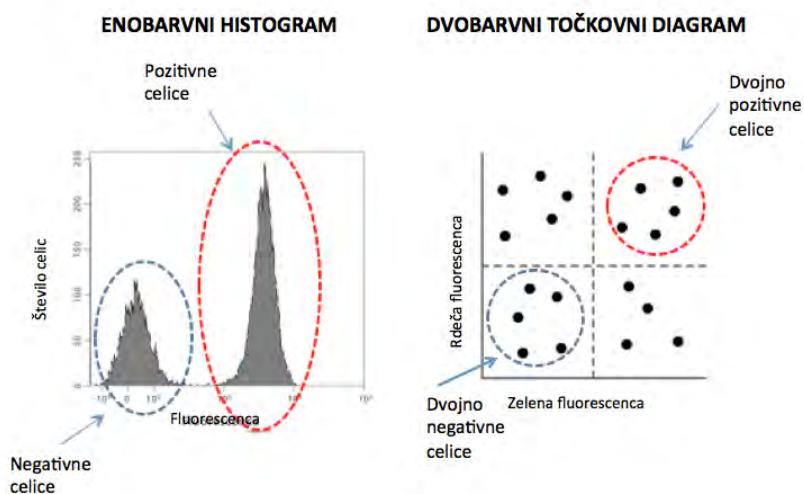
- Pripravi si 400 µl celične suspenzije v pufru za spiranje (2 mM EDTA in 0,5% BSA v pufru D-PBS), v kateri skupno število celic ne bo preseglo 10^8 .
- Dodaj 100 µl z biotinom označenih primarnih protiteles.
- Dobro premešaj in inkubiraj 10 minut v hladilniku.
- Dodaj 5 ml pufra in centrifugiraj 10 minut pri $500 \times g$ na sobni temperaturi.
- Popolnoma odstrani supernatant in celice resuspendiraj v 800 µl pufra.
- Dodaj 200 µl 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 postavi 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 µl 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 µl pufra.
- Zmešaj 10 µl celične suspenzije z 10 µl tripanskega modrila in preštej celice na števni komori za enkratno uporabo.

Izpolni preglednico:

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

3. 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. Fluorokromi, s katerimi so najpogostejše 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 14: Prikaz rezultatov meritve na pretočnem citometru 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.

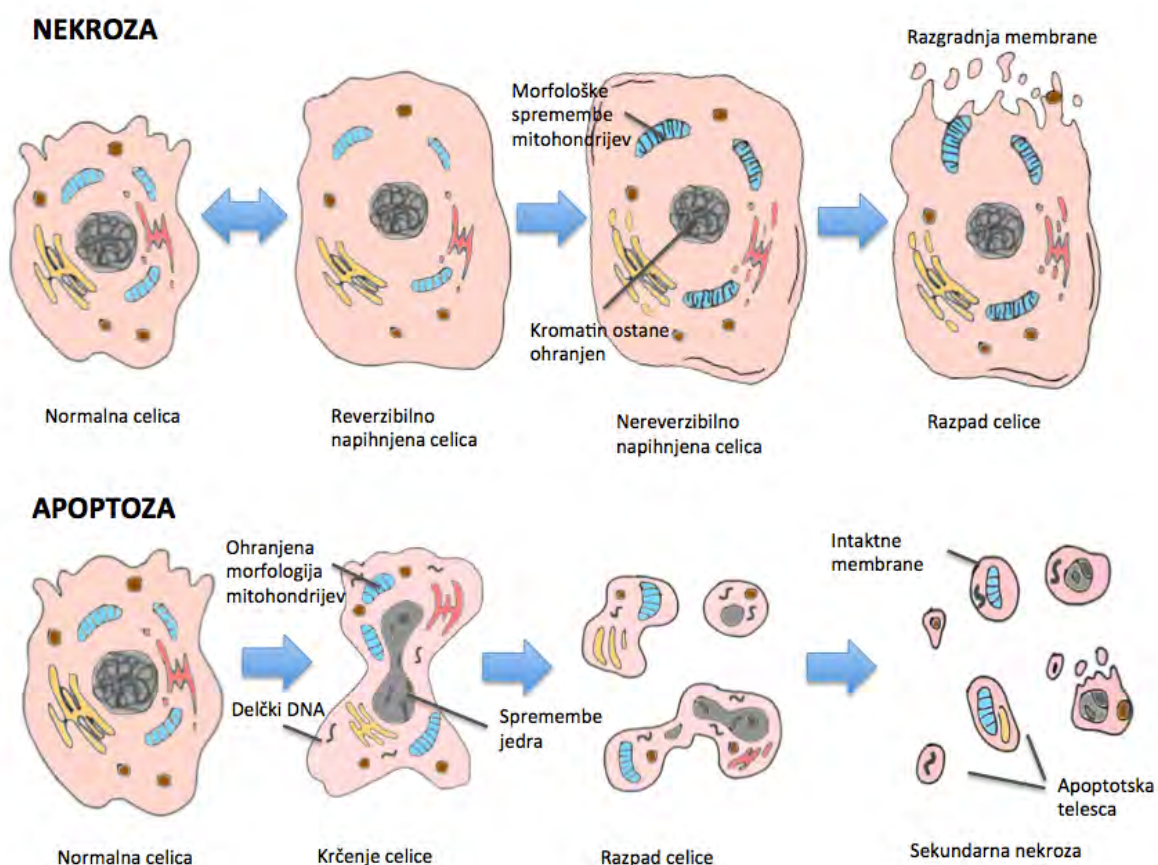
Postopek identifikacije krvotvornih matičnih celic po imunomagnetni depleciji

- Odpipetiraj 100 μ l celične suspenzije LIN-negativne frakcije (10^5 celic) v 5 ml epruveto za pretočni citometer.
- Dodaj 10 μ l s FITC označenih protiteles anti-CD45 in s fikoeritrinom (PE) označenih protiteles anti-CD34. Premešaj in inkubiraj 15 min na sobni temperaturi v temi.
- Dodaj 400 μ l PBS in s pretočnim citometrom določi populacijo KMC.

Vaja 3: Postopki določanja števila in viabilnosti celic

1. Nekroza

Nekroza je smrt celice zaradi delovanja zunanjih dejavnikov, kot so na primer poškodbe, pomanjkanje kisika, strupene snovi, ionizirajoče sevanje. 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.



Slika 15: Nekroza in apoptoza. Prikazane so ključne stopnje v procesih nekroze in apoptoze.

Pri delu s celicami, še posebno pri celicah, ki so namenjene za zdravljenje, moramo vedno preverjati njihovo »živost« oziroma 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, katerih s preprostimi postopki za določanje mrtvih celic ne moremo ločiti od živih.

2. Apoptoza

Apoptoza je natančno uravnavan proces celične smrti, do katerega normalno prihaja med razvojem 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 v zarodku).

Postopek TUNEL (ang. 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.

EKSPERIMENTALNO DELO

1. Štetje celic z uporabo hemocitometra

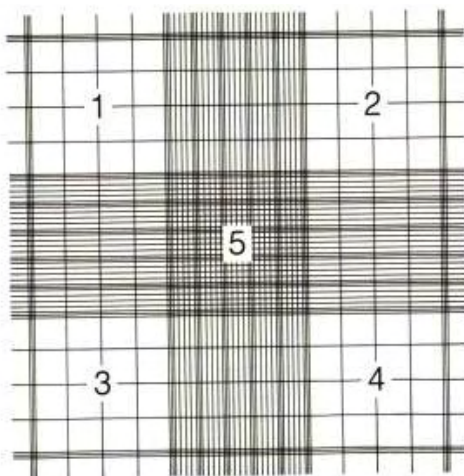
V epici pripravi vzorec za določanje števila viabilnih/mrtvih celic:

- 10 μl celične suspenzije zmešaj z 10 μl tripanskega modrila.
- 10 μl tako pripravljene celične suspenzije nanesi na hemocitometer.
- Na hemocitometru preštej celice na štirih kvadratih (na sliki 16 označeni s številkami) površine 1 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 kvadrata je 1 mm^2 , torej je volumen suspenzije 0,1 μl in faktor = 10^4 .

- Izračunaj skupno število celic v celotni prostornini celične suspenzije.



Slika 16: 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.

2. 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.

3. Štetje celic s pretočnim citometrom: Določanje števila krvotvornih matičnih CD34+ celic z uporabo fluorescenčnih kroglic

»Trucount« (Becton Dickinson) epruvete vsebujejo liofiliziran skupek mikrokroglic, ki se raztopi ob dodatku vzorca. V vsaki epruveti je znano število fluorescenčnih 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 fluorescenčnih 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 fluorescenčne kroglice za štetje, pri čemer preiskovanemu vzorcu kostnega mozga, periferne ali popkovnične krvi dodamo znano število kroglic za štetje. Iz razmerja med preštetim številom fluorescenčnih kroglic in preštetim številom celic, ki so pozitivne na označevalca CD34 in CD45 nato izračunamo absolutno število krvotvornih matičnih celic. CD34 je označevalec KMC, CD45 pa izražajo levkociti (slika 17).

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.

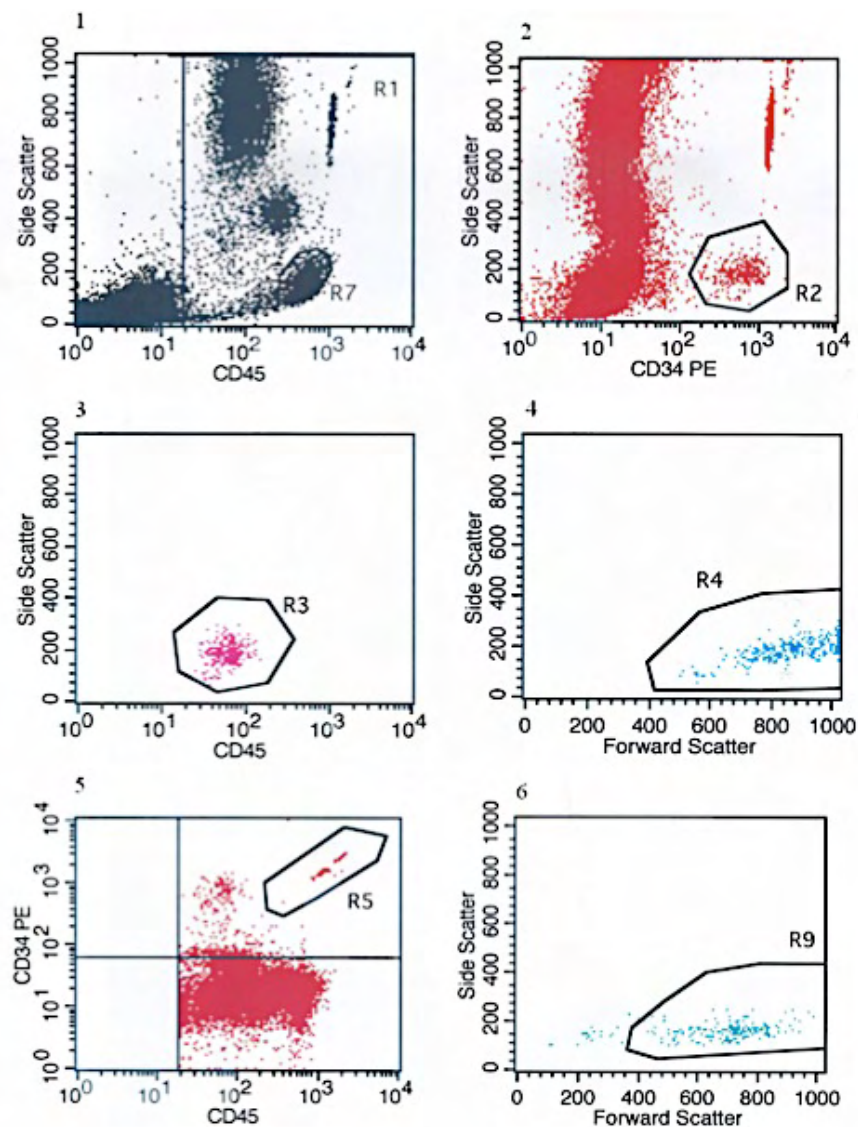
Izračun koncentracije matičnih celic

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

Preglednica:

<i>koncentracija KMC</i>	
<i>celokupno število KMC v pripravku</i>	
<i>odstotek KMC glede na levkocite</i>	

Analiza KMC s pretočnim citometrom je večstopenjska, primer analize je prikazan na sliki 17.



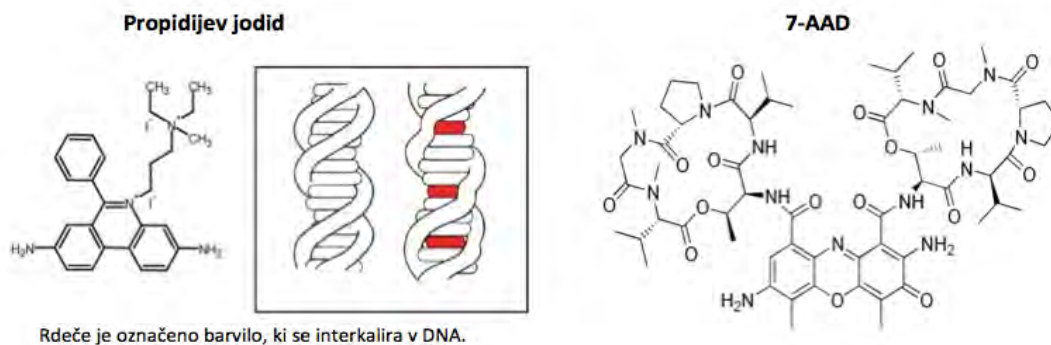
Slika 17: Primer analize populacije CD34 + celic na pretočnem citometru.

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.

4. 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.

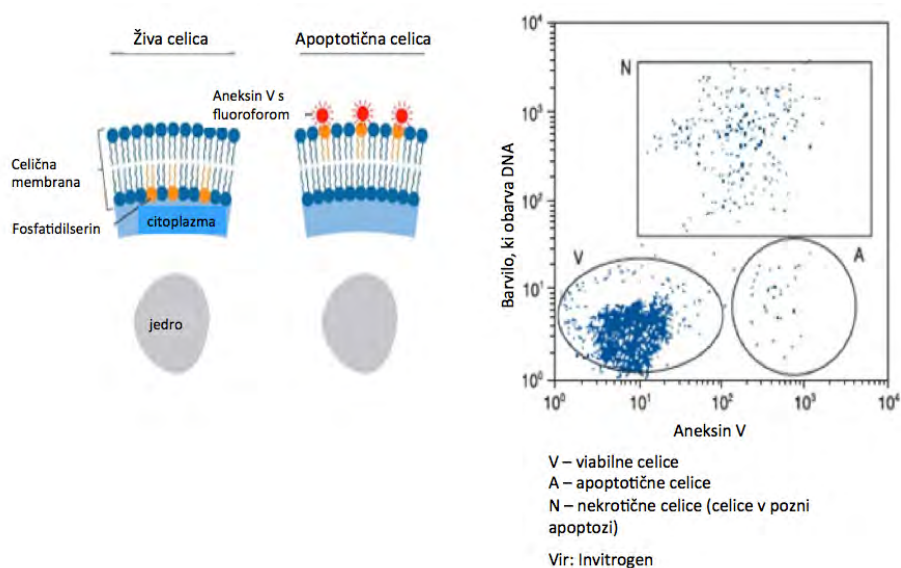


Slika 18: Barvili propidijev jodid in 7-AAD se uporabljata za določanje viabilnosti celic.

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 eksperimentih kjer uporabljamo tudi ti dve barvili.

Barvilo aneksin V

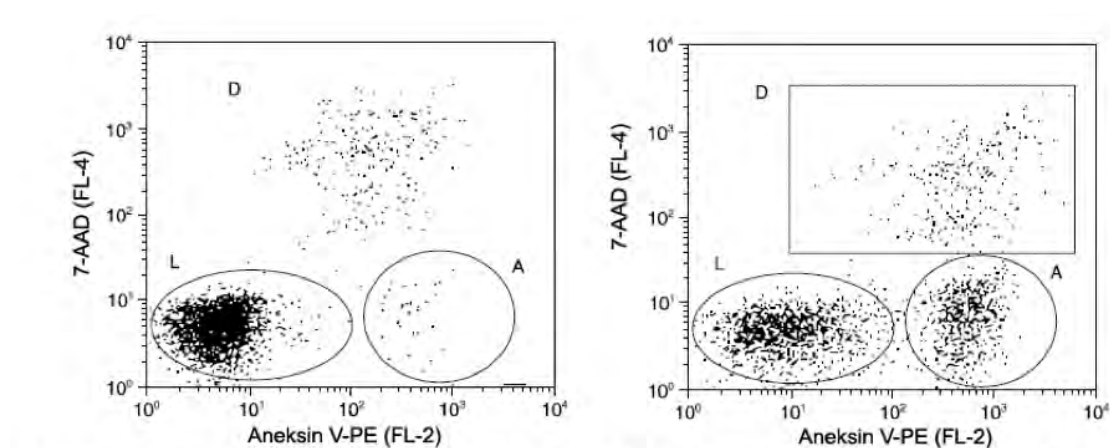
Aneksin V je protein z visoko afiniteto za fosfatidilserin. V normalnih celicah se fosfatidilserin nahaja v notranji plasti celične membrane. Pri apoptozi pa pride do translokacije na zunanjo plast oziroma na površino celice. Z vezavo aneksina V, označenega s fluorokromom ali biotinom, lahko zaznamo apoptotične celice (slika 19).



Slika 19: 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, 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 20: WEHI231 celice, izpostavljene 100 uM TPCK za 2h (desno) in kontrolne celice (levo). A – pro-apoptotične celice ($\text{AnnV}^+/\text{7-AAD}^-$); L – žive celice ($\text{AnnV}^-/\text{7-AAD}^-$); D – mrtve celice ($\text{AnnV}^+/\text{7-AAD}^+$). Pri vzorcu celic, ki so bile izpostavljene TPCK (desno), opazimo večji odstotek pro-apoptotičnih celic.

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 μl (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 μl aneksin V vezavnega pufera.
- Dodaj 10 μl barvila aneksin-V-FITC in 10 μl barvila 7-AAD in premešaj. Vzorec inkubiraj 20 min na sobni T v temi.
- Dodaj 400 μl aneksin V vezavnega pufera in analiziraj s pretočnim citometrom.
- Določi odstotek apoptotičnih in odstotek nekrotičnih celic.

PONAVLJANJE – ODGOVORI NA VPRAŠANJA:
Vaja 1 in 2: Postopki ločevanja in karakterizacije celic
Vaja 3: Postopki določanja števila in viabilnosti celic

Ime in priimek:

1. Zapiši rezultate meritev vseh 4 vzorcev v tabelo. Izračunaj odstotek CD34+ celic glede na vse celice (G1 events) za LIN- in LIN+.

	LIN-			LIN+		
	All (R1)	CD34+	CD34+/ R1	All (R1)	CD34+	CD34+/ R1
popkovnična kri 1						
popkovnična kri 2						
periferna kri 1						
periferna kri 2						

2. Katera vrsta vzorcev bi bila glede na podatke iz tabele bolj primerna kot vir matičnih celic za celične terapije? Naštej vsaj dva razloga, zakaj.
3. Opišite postopke, s katerimi se znebimo eritrocitov iz vzorca krvi.
4. Zakaj je pomembno, da sta tako popkovnična/periferna kri kot Lympholyte®-H segreta na sobno temperaturo?

5. 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.

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

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

pripravek	količina pripravka [ml]	levkociti x 10⁹/l	% CD34+	celokupno št. CD34+	% viabilnosti
levkocitni pripravek po aferezi (LP)	147.0	221.2	0.83	268.3 x 10 ⁶	97.9
pozitivna frakcija po ločevanju (CC)	43.2	4.6	92.5	183.8 x 10 ⁶	99.2

6. S pretočnim citometrom smo določali število krvotvornih matičnih celic (CD34+ celic) v popkovnični krvi. Za analizo smo uporabili 50 μ l vzorca ter 55188 fluorescenčnih kroglic. Določi celokupno število krvotvornih matičnih celic v pripravku popkovnične krvi (27 ml), namenjenem za shranjevanje v banki popkovnične krvi.

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

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

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

Rezultati:

Koncentracija KMC	
Celokupno število KMC v pripravku	
Odstotek KMC glede na levkocite	

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- α), 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, kar pomeni, da dolgotrajna manipulacija celic *in vivo* ni primerna, če jih želimo uporabiti v kliniki.

Klinična uporaba matičnih celic iz maščobnega tkiva 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:

- prikrivanje 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°C , je uporabnih celic manj. Z liposukcijo pridobimo večje število celic kot pri izrezani maščobi.

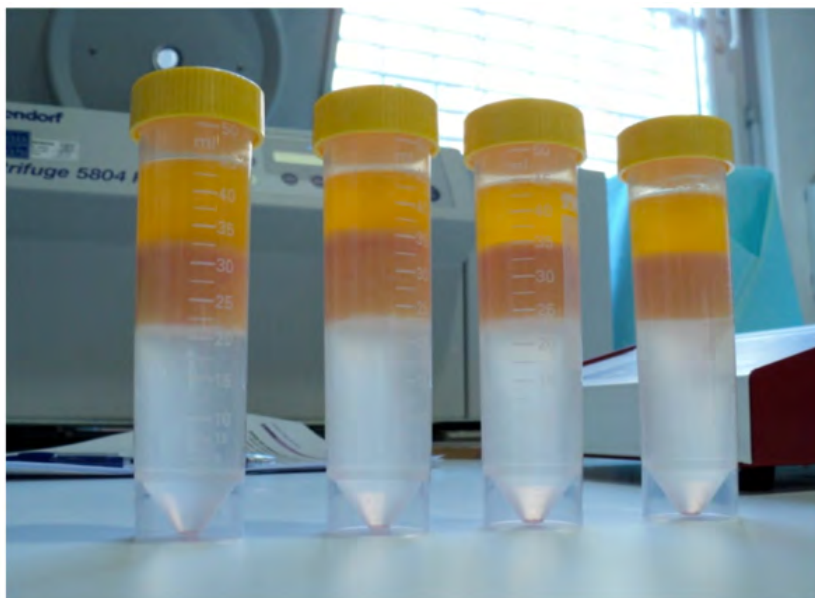
Iz 100 ml lipoaspirata po tretji pasaži pridobimo nekje 80×10^6 celic in po četrti 400×10^6 celic, kar bi zadostovalo za večino potencialnih tkivno-inženirskih presadkov. 100 mL je zelo majhna količina maščobe glede na celotno količino odstranjenega tkiva pri liposukciji.

EKSPERIMENTALNO DELO

1. Izolacija matičnih celic iz maščobnega tkiva

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 21: Vzorec po zadnjem centrifugiranju.

- 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 centrifugirke 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.
- Nasadi celice, analiziraj s pretočno citometrijo in izračunaj število 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

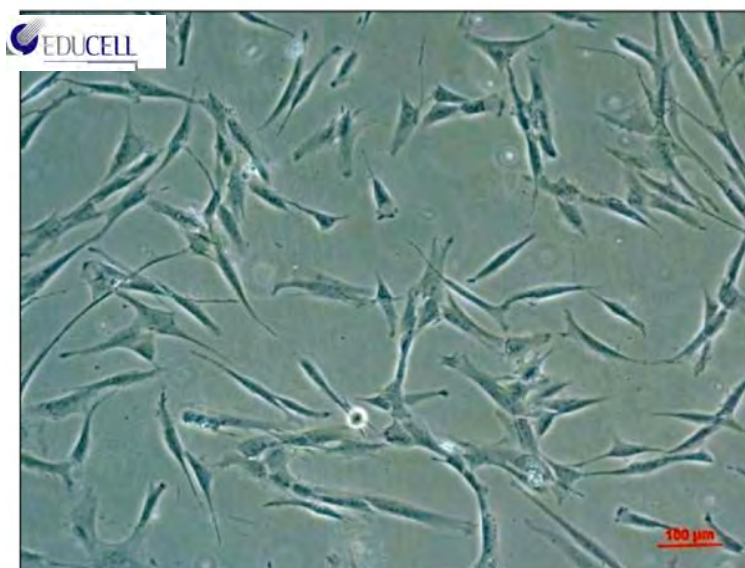
Označevalci za mezenhimske matične celice:

- CD73 (PE anti-human CD73)
- CD271 (PE anti-human CD271)
- CD90 (FITC anti-human CD90)
- CD105 (FITC anti-human CD105 ali endoglin)

Potrebuješ do 1×10^6 celic v 100 µl PBS. Dodaj 10 µl 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 µl 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 22: Matične celice iz maščobe, pasaža 3.

2. Diferenciacija matičnih celic iz maščobe 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:

- 10% serum + 90% DMEM HG (z visoko vsebnostjo glukoze) + 50 ug/ml gentamicina
- 2 mM L-glutamin
- 10 µg/ml inzulin
- 1 µM deksametazon
- 100 µM indometacin
- 500 µM IBMX

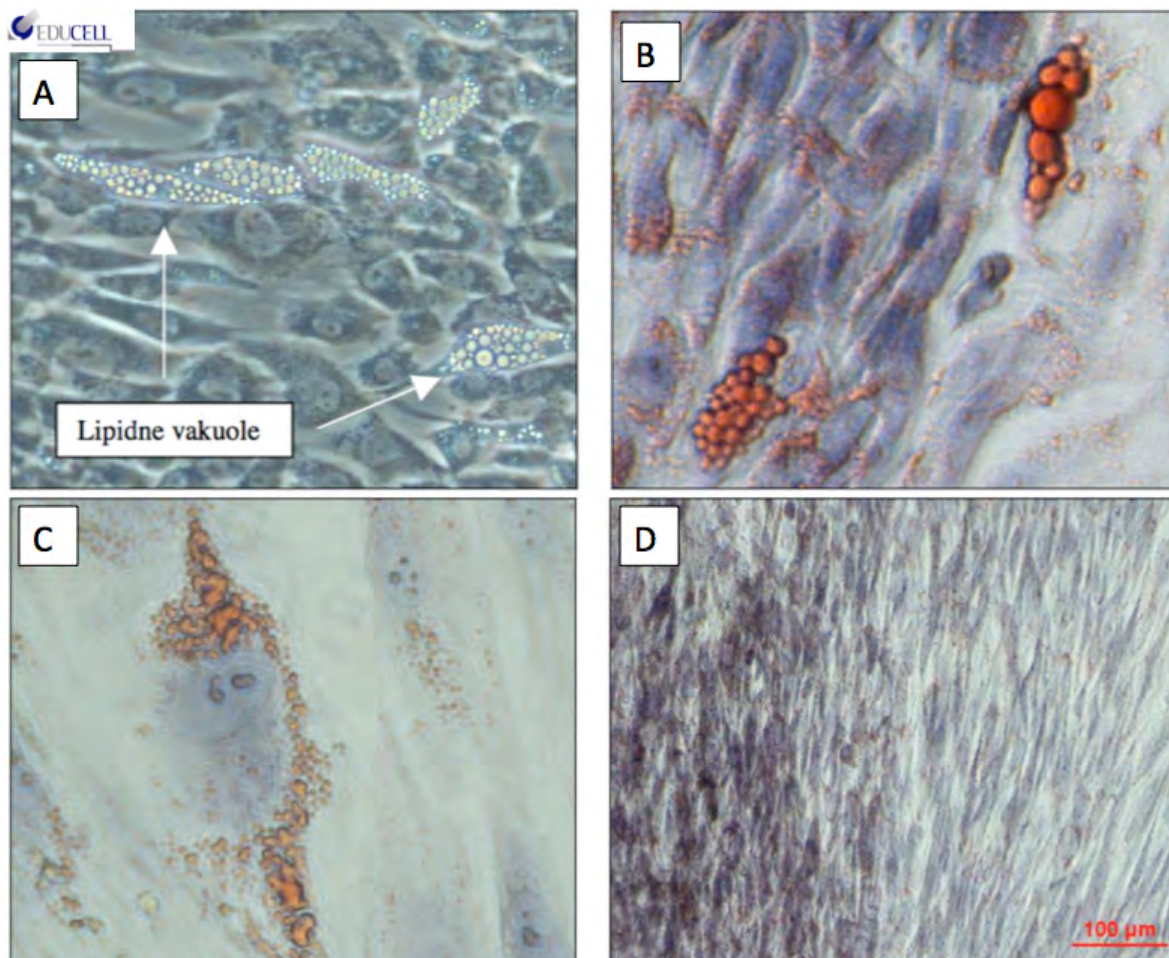
Pri adipogeni indukciji nasadimo celice z gostoto 20 000 celic/cm². Preko noči počakamo, da se celice pritrdijo in nato zamenjamo gojišče z adipoindukcijskim. Gojišče menjujemo vsake 3 dni.

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.
- 10 min inkubiraj v »Mayerjevem hematoksilinu«.
- Nekajkrat 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 23: Metične celice v kulturi lahko diferenciramo v adpipocite. Lipidne vakuole se pobarvajo rdeče (B,C). Neobarvana kultura (A), kontrolne celice kjer do diferenciacije ni prišlo (D).

3. Diferenciacija matičnih celic iz maščobe v kostne celice

Postopek diferenciacije v osteocite:

Priprava osteoindukcijskega gojišča OSTEO CAMBEX (narejeno po navodilih proizvajalca):

- osteogeno gojišče (Cambrex, ZDA)
- 20 µl/ml L-glutamin
- gentamicin
- askorbinska kislina
- deksametazon
- beta glicerolfosfat
- 2.5% ali 5% serum

Za diferenciacijo celice nasadimo v gostoti 5000 celic/cm². Nato gojilno posodico čez noč postavimo v inkubator, da se celice pritrdijo. Naslednji dan gojišče zamenjamo z osteoindukcijskim gojiščem. Za prvi dve menjavi uporabimo gojišče s 5% serumom, nato

koncentracijo zmanjšamo na 2.5 %. Celice vzporedno gojimo tudi v navadnem gojišču, pri čemer odstotek seruma ustreza koncentraciji v indukcijskem gojišču. Te celice uporabimo kot kontrolo osteogene diferenciacije.

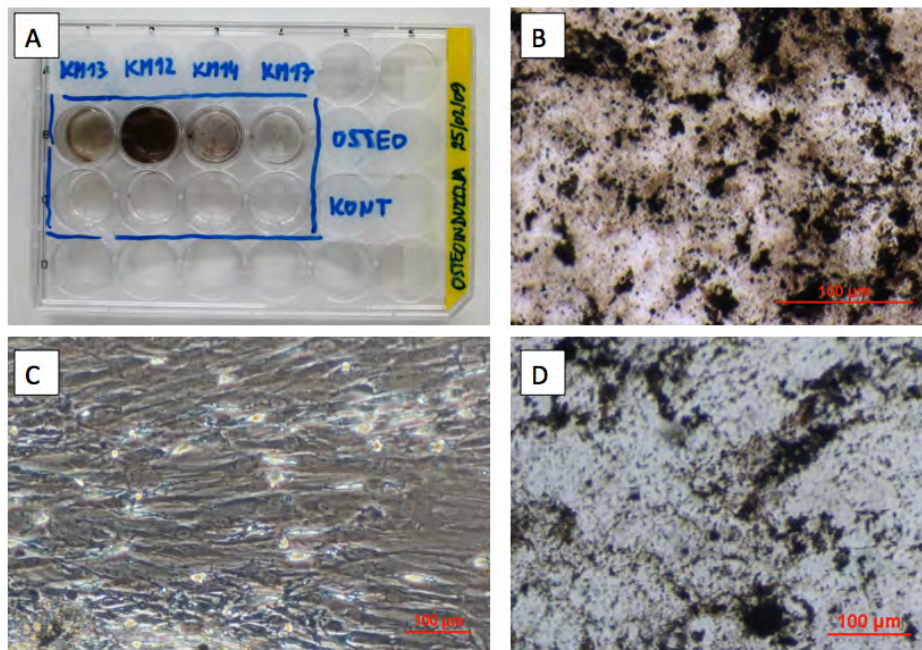
Detekcija kalcijevih depozitov

Diferencirani osteociti (zrele kostne celice) izločajo v matriks poleg kolegena 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 spera z mrzlim PBS.
- Fiksiraj celice s 4% paraformaldehidom 15 minut.
- 2x spera z destilirano vodo.
- Dodaj 2% raztopino srebrovega nitrata in 10 minut inkubiraj v temi.
- 3x spera z destilirano vodo.
- Inkubiraj na svetlobi ali pod UV lučko 15-30 minut.
- 2x spera z destilirano vodo in pogledaj pod mikroskopom.



Slika 24: 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) - (500 µl TCA / 1 luknjico plošče s 24 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	10
b	2	8
c	4	6
d	6	4

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

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

PONAVLJANJE – ODGOVORI NA VPRAŠANJA:
Vaja 4: Izolacija ASC iz maščobnega tkiva

Ime in priimek:

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 (predpostavljaj, da se celice podvojijo 2x na pasažo)?

3. Iz katere zarodne plasti izvirajo maščobne in kostne celice?

4. S katerim postopkom bi lahko še preverjali uspešnost diferenciacije? Na kratko opiši postopek.

Vaja 5: Priprava trombocitnega gela

Trombociti in njihova uporaba

S trombociti bogata plazma (TBP, angl. PRP – »Platelet Rich Plasma«) je plazma z visoko koncentracijo trombocitov. Ob aktivaciji TBP se tvori t. i. trombocitni gel, sestavljen iz fibrina in vanj ujetih trombocitov, 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 25: 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 α -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 tujih (alogenih) pripravkov. Kljub temu tudi pri uporabi alogenske TBP niso opazili nobenih okužb 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, ki so v trombocitnih granulah. Trombocitni gel lahko nanese 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 periodontalni, 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 AB0 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 (ang. 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 26: 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**Priprava trombocitnega gela****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 CaCl_2 in liofiliziranim trombinom poškropi z razkužilom;
 - iz vial s 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 CaCl_2 raztopljen trombin ter ga počasi in ob steni vbrizgaj v s trombociti bogato plazmo.
- Centrifugirko s TBP počasi mešaj.

PONAVLJANJE – ODGOVORI NA VPRAŠANJA:

Vaja 5: Priprava trombocitnega gela

Ime in priimek:

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?

Literatura

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

Bizjak Vesna: Uporaba pretočne citometrije za spremljanje karakteristik celic CHO v bioprocseh. Diplomsko delo 2006, BTH

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.

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.

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.

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.

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.

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, ilustr.

Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981; 78(12): 7634-7638.

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

Rožmen, P., Bolta, Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. Acta dermatovenerologica Alpina, 2007, vol. 16, no. 4, str. 156-165.

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.

Thomas E. D., Lochte H. L., Lu W. C., Ferrebee J. W. Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. N Engl J Med 1957; 257:491-496S

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998; 6;282(5391):1145-7.

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.



Zavod Republike Slovenije
za transfuzijsko medicino