



Univerza v Ljubljani

Biotehniška fakulteta



Zavod Republike Slovenije  
za transfuzijsko medicino  
Slovenian Institute for Transfusion Medicine

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

# ZBIRKA POROČIL ZA LABORATORIJSKE VAJE

IZ PREDMETA TERAPEVTSKA BIOTEHNOLOGIJA

Izr. prof. dr. Elvira Maličev, univ. dipl. biol.

Zbirka poročil za laboratorijske vaje pri predmetu Terapevtska biotehnologija

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID 200043523

ISBN 978-961-6596-23-7 (Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, PDF)

ISBN 978-961-6379-88-5 (Biotehniška fakulteta, PDF)

Zbirka poročil za laboratorijske vaje pri predmetu Terapevtska biotehnologija

*Učni pripomoček za študente*

Elvira Maličev, avtorica

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana;

Biotehniška Fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana

Ljubljana, 2024

# ZBIRKA POROČIL ZA LABORATORIJSKE VAJE

## PRI PREDMETU TERAPEVTSKA BIOTEHNOLOGIJA

Izr. prof. dr. Elvira Maličev, univ. dipl. biol.

### VSEBINA

|                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| UVOD .....                                                                                                                                                                          | 3  |
| VAJA 1: Mezenhimske matične celice (ali mezenhimske stromalne celice, hMSC) – odmrzovanje in nasaditev celic, priprava medijev, začetek adipogene in osteogene diferenciacije ..... | 4  |
| VAJA 2: Določanje imunosupresivne funkcije mezenhimskih matičnih celic (MSC) .....                                                                                                  | 7  |
| VAJA 3: Osamitev limfocitov CD4+ iz suspenzije enojedrnih celic s pozitivno imunomagnetno selekcijo na ločitvenih kolonah .....                                                     | 10 |
| VAJA 4: Izolacija celic kostnega mozga pri neobsevanih miših kot model za razvoj genske terapije pri ljudeh .....                                                                   | 12 |
| VAJA 5: Pridobivanje matičnih celic iz maščobnega tkiva .....                                                                                                                       | 14 |
| VAJA 6: Identifikacija in določanje števila krvotvornih matičnih celic (KMC) v celičnih pripravkih s pretočnim citometrom .....                                                     | 16 |
| VAJA 7: Analiza maščobnih in kostnih celic po diferenciaciji .....                                                                                                                  | 20 |
| LITERATURA .....                                                                                                                                                                    | 22 |

### UVOD

Terapevtska biotehnologija je dinamično interdisciplinarno področje, ki združuje najnovejša odkritja in tehnološke dosežke z namenom izboljšanja zdravstvene oskrbe. Predmet Terapevtska biotehnologija, ki se izvaja kot izbirni predmet na študiju biotehnologije, vključuje teme iz naprednega zdravljenja z uporabo celičnih terapij z matičnimi celicami in diferenciranimi celicami, tkivnega inženirstva, genske terapije ter terapije s pripravki, ki vsebujejo le produkte celic. Poročila, ki jih boste pripravljali, niso le formalnost, temveč ključni del vašega učenja.

**Zbirka poročil za laboratorijske vaje pri predmetu Terapevtska biotehnologija** vsebuje navodila in predlogo za pripravo končnih poročil za laboratorijske vaje. Izpolnjena poročila so pogoj za uspešno zaključen predmet in jih je potrebno do konca semestra naložiti v spletno učilnico. V zbornik so vključeni kratki opisi vaj z razlago, ki vam bo olajšala pripravo poročil. Pri pripravi poročil si pomagajte tudi z literaturo navedeno na koncu zbornika.

Pravilno izpolnjena poročila vam bodo omogočila boljše razumevanje teoretičnih konceptov in njihovo aplikacijo v praksi ter vam pomagala pri pripravi na kolokvij. Srečno!

## **VAJA 1: Mezenhimske matične celice (ali mezenhimske stromalne celice, hMSC) – odmrzovanje in nasaditev celic, priprava medijev, začetek adipogene in osteogene diferenciacije**

---

Matične celice so nediferencirane celice, za katere je značilna sposobnost samoobnavljanja, po drugi strani pa diferenciacija v različne tipe celic. Matične celice so prisotne v zarodku kot tudi v večini tkiv odraslega organizma. Diferenciacija je proces, ki poteka ves čas razvoja in rasti večceličnih organizmov. **Diferenciacijo v *in vitro* pogojih** lahko sprožimo na različne načine, i) z dodajanjem ali odstranjevanjem rastnih delavnikov, citokinov, vitaminov, ii) z dodajanjem sestavin zunajceličnega matriksa ali iii) s pripravo mešanih celičnih kultur.

Vaja 1 je namenjena:

- i) pripravi medijev za odmrzovanje in gojenje mezenhimskih matičnih celic (MSC)
- ii) odmrzovanju MSC, določanju števila in viabilnosti MSC
- iii) nasajanju celic v celične kulture
- iv) pripravi medijev za diferenciacijo MSC. Pri celicah, ki so bile predhodno nasajene in so v konfluentni fazi, z dodatkom ustreznega diferencijskega medija sprožimo diferenciacijo v adipocite oz. v osteoblaste. Po 7-14 dneh gojenja bomo diferenciacijo v adipocite prepoznali po maščobnih kapljicah v celicah, osteocite pa po tvorbi kristalov kalcijevega fosfata.

Pri poročilu Vaje 1 je potrebno izpolniti tabele, ki vključujejo izračune, potrebne za pripravo medijev za odmrzovanje, gojenje in diferenciacijo MSC. V tabele na delovnem listu vpišite potreben volumen reagentov in kemikalij za pripravo 10 mL posameznega medija, glede na založno in končno koncentracijo reagentov.

Pri 2. točki poročila ustrezno vpišite podatke o nasaditvi celic, ki ste jih dobili med izvajanjem vaje. Celokupen volumen celične suspenzije izračunajte glede na količino medija, ki ga boste porabili (upoštevajte volumen medija/luknjico in število uporabljenih luknjic na plošči). Koncentracija celic v suspenziji za nasaditev predstavlja koncentracijo celic, ki jo potrebujemo za uspešno nasaditev celic, pri čemer moramo upoštevati izbrano gostoto nasaditve in površino gojilne posode. Podatek o koncentraciji celic v suspenziji po odmrzovanju med izvedbo vaje pridobite iz avtomatiziranega števca ViCell. Pri izračunih upoštevajte zgolj žive celice. Nato izračunajte, kolikšen volumen odmrznjenih celic in kolikšen volumen gojitvenega medija morate združiti, da dobite predhodno izračunano koncentracijo celic za nasaditev.

### **VPRAŠANJA ZA UTRJEVANJE:**

1. Pojasnite postopek odmrzovanja mezenhimskih matičnih celic. Katere so ključne točke, ki jih morate upoštevati, da zagotovite visoko stopnjo preživetja celic po odmrzovanju?
2. Kateri so osnovni pogoji za gojenje mezenhimskih matičnih celic v celični kulturi?
3. Na kakšen način oz. s katerimi postopki lahko preverjamo uspešnost diferenciacije mezenhimskih matičnih celic?
4. Navedi primer rastnega dejavnika potrebnega za diferenciacijo v adipocite in osteoblaste. Diferenciacije MSC v kateri izmed treh osnovnih tipov celic na vajah nismo preizkusili?

## POROČILO

### Vaja 1: Humane mezenhimske matične celice (hMSC) – odmrzovanje in nasaditev celic, priprava medijev, začetek adipogene in osteogene diferenciacije

#### 1. Priprava medijev

- Medij za odmrzovanje (potrebujemo 10 mL/kriovialo). Izpolni tabelo:

|          | Založna koncentracija | Končna koncentracija | Za 10 mL |
|----------|-----------------------|----------------------|----------|
| FBS      | 100 %                 | 20 %                 |          |
| DMEM/F12 |                       |                      |          |

- Gojitveni medij (potrebujemo 1 mL/luknjico). Izpolni tabelo:

|           | Založna koncentracija | Končna koncentracija | Za 10 mL |
|-----------|-----------------------|----------------------|----------|
| FBS       | 100 %                 | 10 %                 |          |
| pen/strep | 100x                  | 1x                   |          |
| DMEM/F12  |                       |                      |          |

#### 2. Odmrzovanje in nasaditev celic

Za izračun upoštevajte naslednje:

- Nasadili bomo 10.000 celic/cm<sup>2</sup> spodnje površine gojilne posode (upoštevamo, da ima ena luknjica površino 3,8 cm<sup>2</sup>)
- Nasadili bomo 6 luknjic na ploščo z 12 luknjicami:
  - kontrolna skupina
  - osteogena diferenciacija
  - adipogena diferenciacija
- Za vsako luknjico potrebujemo 1 mL gojitvenega medija
- Iz izmerjene koncentracije celic (aparatura ViCell) preračunamo, kolikšen volumen celične suspenzije moramo dodati v gojitveni medij, da bomo lahko nasadili celice s končno koncentracijo 10.000 celic/cm<sup>2</sup> v 6 luknjic

**Izpolni tabelo:**

|                                                                         |  |
|-------------------------------------------------------------------------|--|
| celokupni volumen celične suspenzije za nasajanje + 10 % [mL]           |  |
| koncentracija celic v suspenziji za nasaditev [št. celic/mL]            |  |
| koncentracija celic v suspenziji po odmrzovanju (ViCell) [št. celic/mL] |  |
| volumni za nasajanje:                                                   |  |
| a) volumen celične suspenzije [μL]                                      |  |
| b) volumen gojitvenega medija [mL]                                      |  |

### 3. Priprava medijev za diferenciacijo

- Medij za adipogeno diferenciacijo. Izpolni tabelo:

|              | Založna koncentracija | Končna koncentracija | Za 10 mL |
|--------------|-----------------------|----------------------|----------|
| FBS          | 100 %                 | 10 %                 |          |
| inzulin      | 10 mg/mL              | 10 µg/mL             |          |
| deksametazon | 10 µM                 | 1 µM                 |          |
| indometacin  | 36,3 mM               | 200 µM               |          |
| IBMX         | 45 mM                 | 500 µM               |          |
| pen/strep    | 100x                  | 1x                   |          |
| DMEM/F12     |                       |                      |          |

- Medij za osteogeno diferenciacijo. Izpolni tabelo:

|                     | Založna koncentracija | Končna koncentracija | Za 10 mL |
|---------------------|-----------------------|----------------------|----------|
| FBS                 | 100 %                 | 5 %                  |          |
| β-glicerofosfat     | 1 M                   | 10 mM                |          |
| deksametazon        | 10 µM                 | 100 nM               |          |
| askorbinska kislina | 5 mM                  | 100 µM               |          |
| pen/strep           | 100x                  | 1x                   |          |
| DMEM/F12            |                       |                      |          |

### 4. Opiši morfološke spremembe MSC po pripravi adherentne celične kulture.

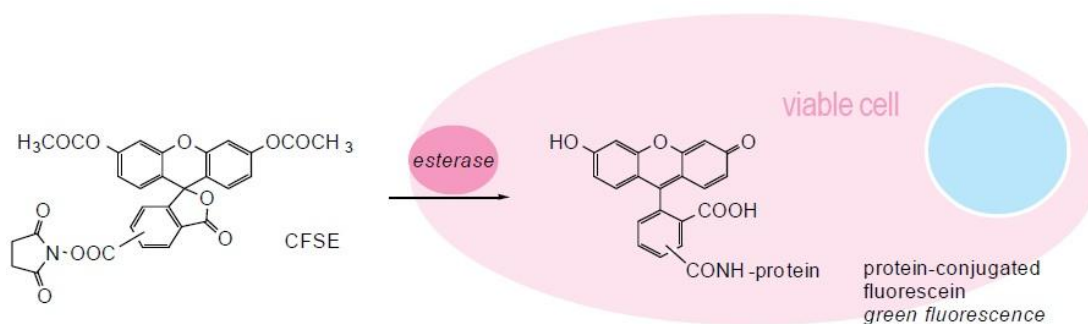
.....

IME IN PRIIMEK: ..... *Izpolnjen list oddaj na spletno učilnico!*

## VAJA 2: Določanje imunosupresivne funkcije mezenhimskih matičnih celic (MSC)

Predaktivacija (ali tudi licenciranje) MSC je priprava celic za določeno funkcijo, ki vključuje celično aktivacijo, molekulsko signaliziranje, genetske in epigenetske modifikacije ter morfološke/fenotipske spremembe. Njen namen je izboljšanje funkcije, preživetja in terapevtske učinkovitosti MSC. Strategije predaktivacije obsegajo: modifikacije pogojev gojenja (npr. hipoksija, viseče kapljice), dodatek citokinov ali rastnih dejavnikov v gojilni medij (npr. IFN- $\gamma$ ) in dodatek farmakološko aktivnih malih molekul.

S testom imunosupresivne funkcije MSC bomo ugotavljali, kako tretiranje MSC z IFN- $\gamma$  vpliva na njihovo delovanje. Stopnjo imunosupresivne funkcije bomo določili na podlagi zaviranja proliferacije aktiviranih limfocitov. Eden izmed načinov spremljanja proliferacije je meritev fluorescence znotrajceličnega barvila, kot je npr. karboksifluorescein sukcinimidil ester (CFSE).



Slika 1: Barvilo CFSE prehaja skozi celično membrano in obarva citoplazmo.

### VPRAŠANJA ZA UTRJEVANJE:

1. Kako deluje barvilo CFSE?
2. Opiši princip določanja števila delitev celic s pretočno citometrijo po barvju s CFSE.
3. S katero aparaturo lahko še opazujemo celice obarvane s CFSE?
4. Na primeru opiši imunosupresivno delovanje MSC.

## POROČILO

### Vaja 2: Določanje imunosupresivne funkcije mezenhimskih matičnih celic (MSC)

#### 1. Tripsinizacija in nasaditev MSC: izpolni tabelo

|                                                          |  |
|----------------------------------------------------------|--|
| koncentracija MSC v suspenziji po tripsinizaciji         |  |
| število celic za nasajanje                               |  |
| celokupni volumen celične suspenzije za nasajanje        |  |
| <b>Priprava ____ mL celične suspenzije za nasajanje:</b> |  |
| volumen celične suspenzije po tripsinizaciji             |  |
| volumen gojitvenega medija                               |  |

#### 2. Izpolni načrt nasaditve:

|          |                                                                                             |                                                                                             |                                                                                             |                                                                                             |                                                                                             |                                                                                             |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
|          | <b>1</b>                                                                                    | <b>2</b>                                                                                    | <b>3</b>                                                                                    | <b>4</b>                                                                                    | <b>5</b>                                                                                    | <b>6</b>                                                                                    |
| <b>A</b> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> |
| <b>B</b> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> |
| <b>C</b> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> |
| <b>D</b> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> | <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; border-radius: 50%;"></div> |

#### 3. Označevanje PBMC s CFSE: izpolni tabelo

|                                             |  |
|---------------------------------------------|--|
| koncentracija neobarvanih PBMC v suspenziji |  |
| celokupno število neobarvanih PBMC          |  |
| koncentracija s CFSE označenih PBMC         |  |
| celokupno število s CFSE označenih PBMC     |  |



| Priprava ____ mL celične suspenzije za nasajanje: |  |
|---------------------------------------------------|--|
| volumen celične suspenzije                        |  |
| volumen gojitvenega medija                        |  |

### Primerjava netretiranih in z IFN- $\gamma$ licenciranih MSC

Za izračun stopnje inhibicije proliferacije uporabi formulo:

$$\text{inhibicija [\%]} = 100 \% - \frac{\text{proliferacija v kokulturi [\%]}}{\text{poz.kontrola [\%]}}$$

### Rezultati:

.....

IME IN PRIIMEK: ..... Izpolnjen list oddaj na spletno učilnico!

### **VAJA 3: Osamitev limfocitov CD4+ iz suspenzije enojedrnih celic s pozitivno imunomagnetno selekcijo na ločitvenih kolonah**

---

Protitelesa z vezanimi magnetnimi delci nam omogočajo ločevanje v magnetnem polju (npr. MACS, ang. Magnetic Activated Cell Sorting). Celice označene z magnetnimi delci (protitelesi) po odstranitvi iz magnetnega polja enostavno zberemo v epruvete brez uporabe dodatnih postopkov, ki bi lahko negativno vplivali nanje.

Pred ločevanjem enojedrne krvne celice (PBMC) najprej koncentriramo z gradientnim centrifugiranjem. Vzorec periferne ali popkovnične krvi (tudi kostnega mozga) previdno naneseemo nad plast gradientnega medija tako, da se plasti ne premešata, in centrifugiramo. Nato celice inkubiramo z anti-CD4 protitelesi.

#### **VPRAŠANJA ZA UTRJEVANJE:**

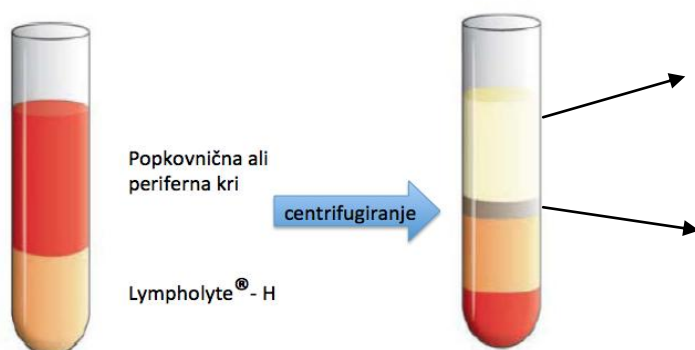
1. Zakaj celice krvi najprej ločujemo z gradientnim centrifugiranjem?
2. Na katerem principu temelji ločevanje celic z gradientnim centrifugiranjem?
3. Kako se različne krvne komponente ločijo med gradientnim centrifugiranjem?
4. Opiši pozitivno in negativno imunomagnetno selekcijo na ločitvenih kolonah.

## POROČILO

### Vaja 3: Osamitev limfocitov CD4<sup>+</sup> iz suspenzije enojedrnih celic s pozitivno imunomagnetno selekcijo na ločitvenih kolonah

Po eluciji CD4<sup>+</sup> celic iz kolone izračunajte čistost frakcije CD4<sup>+</sup> celic in izkoristek izolacijskega postopka, oz. izgubo celic, ki jih ločujemo z imunomagnetno selekcijo.

#### 1. Označi plasti po gradientnem centrifugiranju:



#### 2. Analiza izkoristka in čistosti imunomagnetne selekcije s pretočno citometrijo (računska naloga)

Izpolni tabelo:

|                                                          |  |                                                     |  |                                                     |  |
|----------------------------------------------------------|--|-----------------------------------------------------|--|-----------------------------------------------------|--|
| koncentracija WBC (CD45 <sup>+</sup> ) po izolaciji PBMC |  | koncentracija CD45 <sup>+</sup> v nevezani frakciji |  | koncentracija CD45 <sup>+</sup> v eluirani frakciji |  |
| volumen PBMC                                             |  | volumen nevezane frakcije                           |  | volumen eluirane frakcije                           |  |
| delež CD4 <sup>+</sup>                                   |  | delež CD4 <sup>+</sup>                              |  | delež CD4 <sup>+</sup>                              |  |

Izračunani izkoristek ločevanja:

.....

Izračunana čistost frakcije CD4<sup>+</sup> celic:

.....

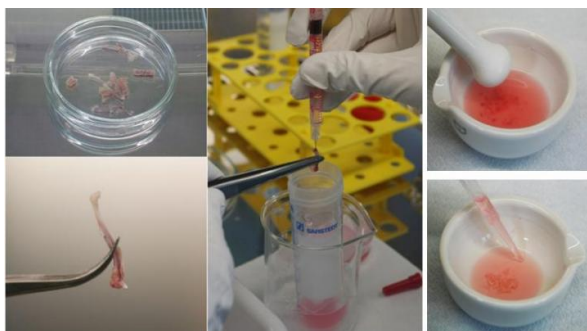
IME IN PRIIMEK: ..... *Izpolnjen list oddaj na spletno učilnico!*

## VAJA 4: Izolacija celic kostnega mozga pri neobsevanih miših kot model za razvoj genske terapije pri ljudeh

Bolezni krvotvornega in imunskega sistema lahko zdravimo z alogensko presaditvijo krvotvornih matičnih celic ali z avtologno gensko terapijo, ki temelji na popravljanju enega ali več genov, ki so vzrok za bolezen. Po presaditvi matičnih celic moramo v bolniku doseči zadostni himerizem, kar pomeni, da ima v telesu dovolj zdravih matičnih celic v primerjavi z bolnimi.

Te raziskave (npr. za ugotavljanje števila celic, ki bi jih morali presaditi, da dosežemo ustrezen himerizem, delovanje niše in vgnezditev presajenih celic...) običajno izvajamo z živalskimi modeli. **Za izolacijo krvotvornih matičnih celic iz kostnega mozga pri miših uporabljamo dve metodi: spiranje kostnega mozga iz votlih kosti in trenje kosti.** Vaja 4 je namenjena predstavitvi postopka pridobivanja celic kostnega mozga s trenjem kosti evtanazirane miši. Pridobljeno celično suspenzijo spiramo, liziramo eritrocite, preštejemo krvotvorne matične celice ter suspenzijo pripravimo za presaditev.

Poročilo Vaje 4 je sestavljeno iz odgovorov na vprašanja, ki se nanašajo na izolacijo in presaditev kostnega mozga. Pri reševanju si lahko pomagata s skripto za vaje. Pri prvem vprašanju je potreben izračun, ki nakazuje na to kako pripravimo želeno koncentracijo celic za presaditev iz izolirane suspenzije krvotvornih matičnih celic.



Slika 2: Postopek spiranja in trenja kosti za izolacijo celic kostnega mozga

### VPRAŠANJA ZA UTRJEVANJE:

1. Kaj je himerizem in kako se doseže v kontekstu genske terapije ali alogenske presaditve krvotvornih matičnih celic?
2. Pojasnite, zakaj so mišji modeli pomembni v biomedicinskih raziskavah. Kakšne so prednosti in slabosti uporabe miši kot modelnih organizmov za preučevanje človeških bolezni?
3. Katere metode in tehnike se uporabljajo za ločevanje in obogatitev KMC iz kostnega mozga?
4. Katere metode se uporabljajo za merjenje uspešnosti presaditve krvotvornih matičnih celic pri miših oz. določitve himerizma?

POROČILO

**Vaja 4: Izolacija in presaditev celic kostnega mozga pri neobsevanih miših kot model za razvoj genske terapije pri ljudeh**

Literatura: Skripta za vaje Terapevtska biotehnologija, stran 56.

1. Po izolaciji celic kostnega mozga smo določili koncentracijo  $132 \times 10^6$  celic, ki smo jih resuspendirali v 1mL DPBS. Za presaditev moramo pripraviti koncentracijo  $20 \times 10^5$  celic v 200  $\mu$ L DPBS.

IZRAČUN:

2. Kaj je načelo 3R, ki se ga držimo pri delu s poskusnimi živalmi, in zakaj je pomembno?
3. Zakaj smo izbrali postopek trenja namesto postopka spiranja za izolacijo celic kostnega mozga?
4. Zakaj je pomembno vnaprej določiti humane končne točke?

.....

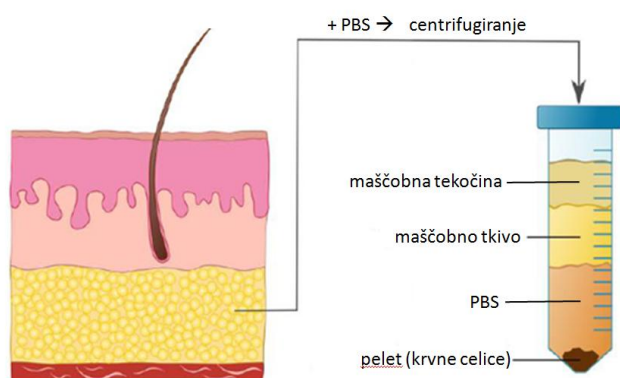
IME IN PRIIMEK: ..... *Izpolnjen list oddaj na spletno učilnico!*

## VAJA 5: Pridobivanje matičnih celic iz maščobnega tkiva

Matične celice iz kostnega mozga imajo 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. Maščobno tkivo lahko namreč pridobimo z izrezanjem ali z liposukcijo. Matične celice iz maščobnega tkiva imenujemo ASC (angl. Adipose Derived Stem Cells).

Vaja 5 je namenjena ločitvi maščobnega tkiva na 4 sloje s pomočjo centrifugiranja in spiranja maščobnega tkiva. Za izolacijo matičnih celic je potrebna še obdelava tkiva z encimom kolagenaze. Kolagenaza je eden od proteolitičnih encimov, ki omogočijo razgradnjo zunajceličnega matriksa, ki obdaja celice v tkivih, in na ta način sprošča celice. Proteolitično reakcijo ustavimo z dodatkom medija s serumom, ki vsebuje inhibitorje encimov. Fenotip ASC preverimo s pretočnim citometrom.

Pri poročilu Vaje 5 je ključen izračun volumna založne raztopine kolagenaze, ki ga bomo potrebovali za obdelavo spranega maščobnega tkiva. Raztopino kolagenaze boste pripravili v gojišču DMEM/F12. Izračunati je potrebno še volumne za pripravo raztopine, ki jo potrebujemo za deaktivacijo kolagenaze, pripravljene iz seruma in gojišča.



Slika 3: Ločitev slojev po centrifugiranju

### VPRAŠANJA ZA UTRJEVANJE:

1. Katere postopke za izolacijo matičnih celic iz tkiva bi še lahko uporabili? Kakšne so prednosti uporabe kolagenaze?
2. Katere metode bi uporabili za oceno kakovosti in vitalnosti matičnih celic, izoliranih iz maščobnega tkiva? Kako te metode delujejo in kakšne rezultate bi pričakovali, da bi potrdili uspešnost izolacije.
3. Opišite nekaj možnosti uporabe matičnih celic izoliranih iz maščobnega tkiva, v medicini in raziskavah.

POROČILO

**Vaja 5: Pridobivanje matičnih celic iz maščobnega tkiva**

**1. Priprava raztopine kolagenaze za razgradnjo. Izpolni tabelo:**

Maščobo in raztopino kolagenaze za razgradnjo mešamo v razmerju 1:1.

|            | Založna koncentracija | Delovna koncentracija | Za 10 mL |
|------------|-----------------------|-----------------------|----------|
| kolagenaza | 7,5 U/ml              | 0,3 U/ml              |          |
| DMEM/F12   |                       |                       |          |

**2. Priprava raztopine za deaktivacijo kolagenaze. Izpolni tabelo:**

|          | Založna koncentracija | Končna koncentracija | Za 20 mL |
|----------|-----------------------|----------------------|----------|
| FBS      | 100 %                 | 10 %                 |          |
| DMEM/F12 |                       |                      |          |

**3. S katerim laboratorijskim postopkom določimo fenotip in koncentracijo izoliranih ASC?**

**4. S katerim testom določimo diferenciacijske sposobnosti izoliranih ASC?**

IME IN PRIIMEK: ..... *Izpolnjen list oddaj na spletno učilnico!*

## **VAJA 6: Identifikacija in določanje števila krvotvornih matičnih celic (KMC) v celičnih pripravkih s pretočnim citometrom**

---

Vaja 6 sestoji iz teoretičnega in praktičnega dela. Pri teoretičnemu delu boste predelali različne postopke štetja celic, ki se lahko izvaja ročno z uporabo hemocitometra ali pa z avtomatskih števcem. Štetje celic je ključnega pomena za raziskave in aplikacije v kliničnih okoljih. Poznavanje števila celic mogoča natančno in dosledno delo s celičnimi kulturami, npr. pri pripravi vzorcev za nadaljnje analize, sledenju rasti celičnih kultur, določitve koncentracije celic v suspenziji, določitvi doze za presaditev itd.

**Za razliko od številnih krvnih in imunskih celic lahko število matičnih celic določimo le s pretočnim citometrom!** Pri tem uporabljamo protitelesa usmerjena proti specifičnim celičnim označevalcem. Protitelesa imajo vezane fluorokrome, ki omogočajo prepoznavo celic s pretočno citometrijo. Večina postopkov določanje števila celic s pretočnim citometrom vsebuje še uporabo kroglic za štetje.

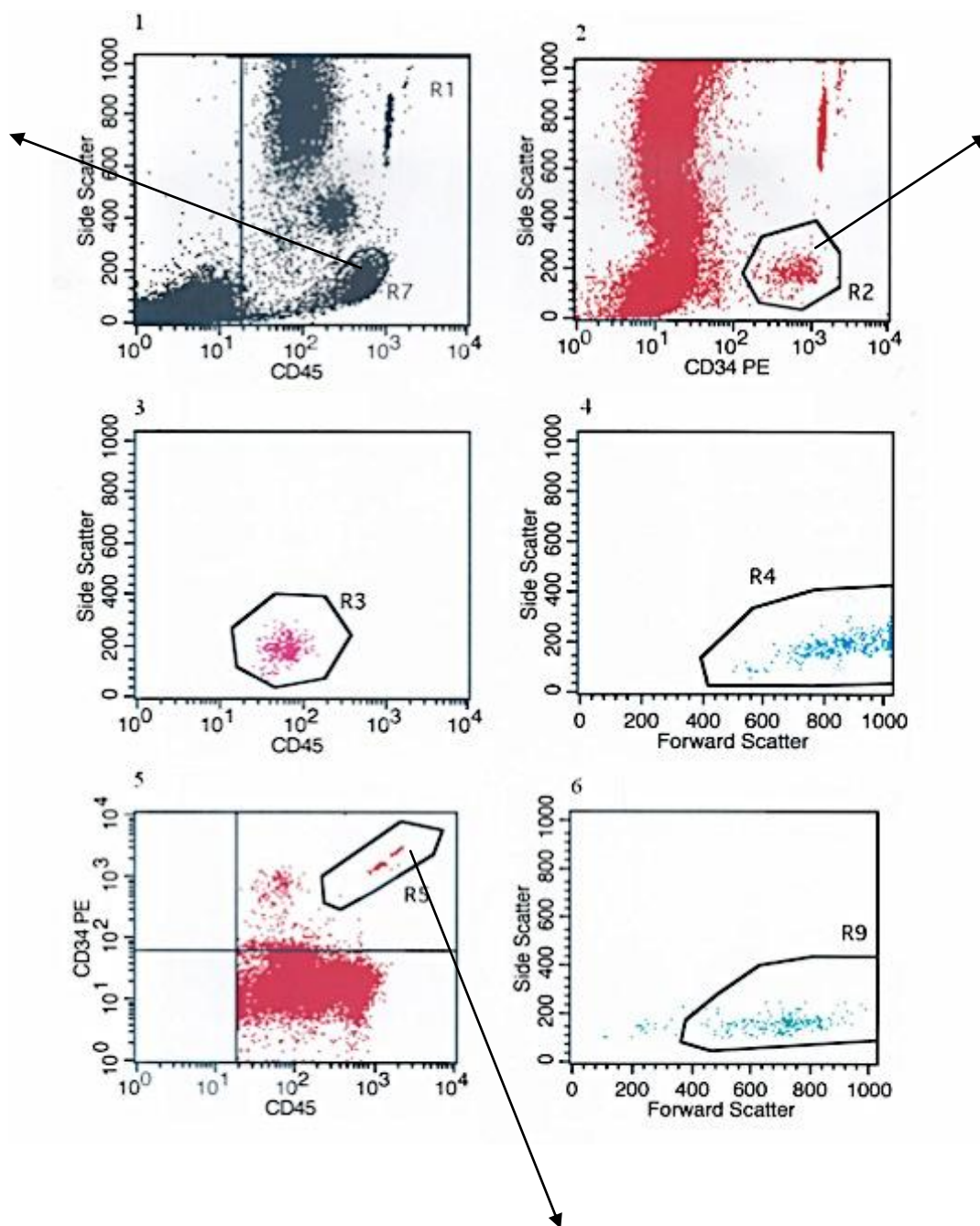
Pri izvedbi Vaje 6. boste vzorec s KMC analizirali s pretočnim citometrom. Vaša naloga je, da iz dobljenih podatkov o številu prešteti celic in fluorescenčnih kalibracijskih kroglic izračunate koncentracijo KMC v analiziranemu pripravku. V nadaljevanju upoštevajte volumen in podatke o koncentraciji levkocitov (WBC, ta podatek je iz hemacitometra) v istem pripravku in izračunajte celokupno število KMC in odstotek teh glede na levkocite. Pri izračunih upoštevajte tudi podatke o viabilnosti KMC.

### **VPRAŠANJA ZA UTRJEVANJE:**

1. Katere označevalce ste uporabili za identifikacijo KMC s pretočnim citometrom?
2. Kakšne so prednosti in slabosti avtomatskega štetja celic v primetrvavi s pretočno citometrijo?
3. Razložite princip delovanja barvila 7-AAD za spremljanje živosti celic s pretočnim citometrom.



4. Poimenujte označene populacije na spodnjih točkovnih diagramih:



## POROČILO

### **Vaja 6: Identifikacija in določanje števila krvotvornih matičnih celic (KMC) v celičnih pripravkih s pretočnim citometrom**

Teoretični del:

- Štetje celic s hemocitometrom
- Štetje celic z uporabo avtomatskega števca »Vicell«

Praktični del:

- Fluorescenčno označevanje in analiza celic s pretočnim citometrom (ISHAGE protokol)
- Liza eritrocitov
- Izračun koncentracije matičnih celic

**1. Po analizi vzorcev s pretočnim citometrom izpiši podatke, ki jih boš potreboval za izračune.**

| Gate              | Število analiziranih celic (events) |
|-------------------|-------------------------------------|
| R4 (CD34+)        |                                     |
| R5 (fluor. beads) |                                     |

**2. Izračunaj koncentracijo KMC, %KMC in celokupno število KMC v pripravku.**

Koncentracijo levkocitov (WBC) izpiši iz hemograma.

### 3. Izpolni tabelo:

|                                                     | Količina pripravka (mL) | Levkociti ( $\times 10^9/L$ ) | Delež CD34+ (%) | Celokupno št. CD34+ | Viabilnost (%) |
|-----------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------|---------------------|----------------|
| pripravek celic po aferezi (LP)                     |                         |                               |                 |                     |                |
| pozitivna frakcija po imunomagnetnem ločevanju (CC) |                         |                               |                 |                     |                |

V primeru, da imaš podatke za CC, izračunaj tudi izkoristek postopka in čistost KMC:

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

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

.....

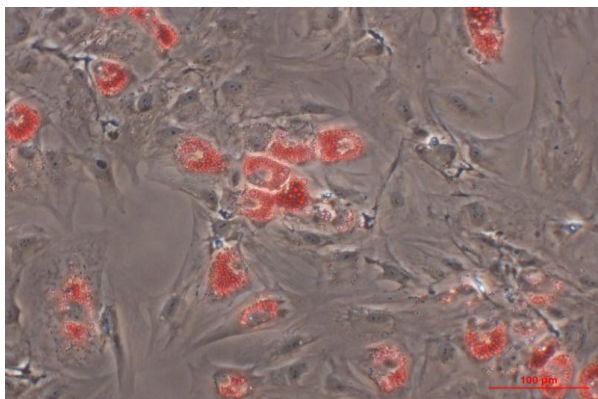
IME IN PRIIMEK: ..... Izpolnjen list oddaj na spletno učilnico!

## VAJA 7: Analiza maščobnih in kostnih celic po diferenciaciji

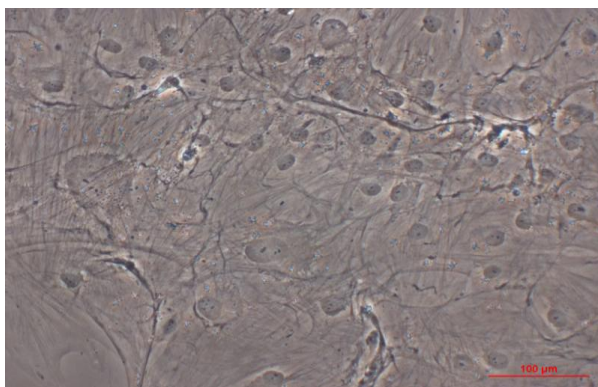
Po indukciji diferenciacije se matične celice ne hajo pomnoževati. Po 2-3 tednih diferencirane celice obarvamo, da jih lahko identificiramo.

### POROČILO

#### Vaja 7: Analiza maščobnih in kostnih celic po diferenciaciji

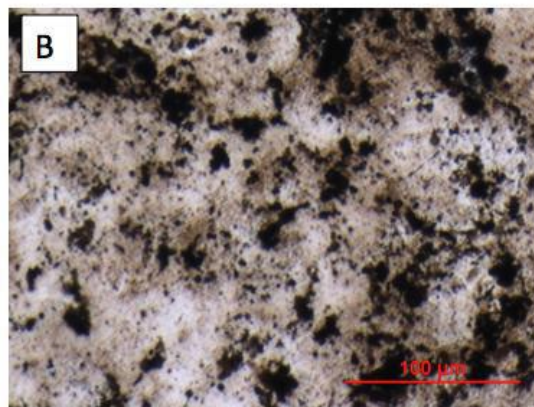


Slika 4A: Maščobne celice ali adipociti.



Slika 4B: Kontrolna celična kultura.

1. Adipocite v celični kulturi smo identificirali z uporabo ..... barvila, ki obarva ..... (katere celične strukture).

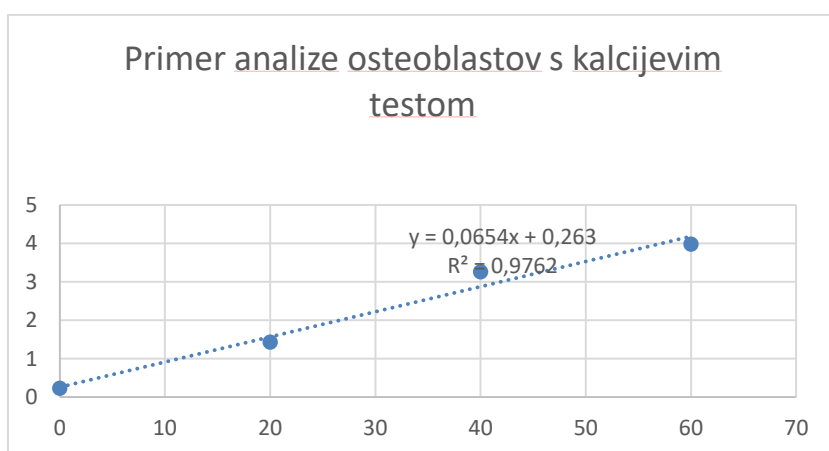


Slika 5: Kostne celice ali osteociti.

2. Na sliki A in B je prikazana uspešna diferenciacija matičnih celic v osteocite, ki smo jih identificirali z metodo barvanja ..... . Pri tem črna barva v celični kulturi označuje .....

### 3. Kalcijev test za dokaz osteogene diferenciacije

Priprava standardnih raztopin za umeritveno krivuljo: S spektrofotometrom izmeri absorbanco pri 550 nm in 660 nm (ozadje). Na osnovi dobljenih podatkov za standardne raztopine nariši graf – umeritveno krivuljo, ki prikazuje **absorbanco v odvisnosti od koncentracije standarda ( $\mu\text{g/mL}$ )**.



Slika 6: Primer umeritvene krivulje za kalcijev test.

S pomočjo enačbe umeritvene krivulje izračunaj X, ki nam pove, kakšna je koncentracija kalcija v vzorcu.

Izračun:

.....

IME IN PRIIMEK: ..... Izpolnjen list oddaj na spletno učilnico!

## LITERATURA

---

MALIČEV, Elvira, JEŽ, Mojca. *Terapevtska biotehnologija : učbenik za vaje*. Dopolnjena izd. Ljubljana: Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, 2019.

MALIČEV, Elvira, ŠVAJGER, Urban. *Biotehnologija mezenhimskih matičnih celic : učbenik za študente*. Ljubljana: Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, 2019.