

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Katerina JAZBEC

**SERIJSKA PRESADITEV KOSTNEGA MOZGA
PRI NEOBSEVANIH MIŠIH BALB/C**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Katerina JAZBEC

**SERIJSKA PRESADITEV KOSTNEGA MOZGA
PRI NEOBSEVANIH MIŠIH BALB/C**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CONSECUTIVE BONE MARROW TRANSPLANTATION
IN NON-IRRADIATED BALB/C MICE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v celičnem laboratoriju centra za imunohematologijo na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

Komisija za študijske zadeve Oddelka za biologijo je na seji dne 21. 2. 2014 za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Primoža Rožmana in za recenzenta prof. dr. Marka Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Jasna ŠTRUS
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: izr. prof. dr. Primož ROŽMAN, dr. med.
Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Član: prof. dr. Marko KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Katerina JAZBEC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 6:616.419(043.2)=163.6
KG	presaditev kostnega mozga/kostni mozeg/ miši/krvotvorne matične celice/izolacija kostnega mozga /niše kostnega mozga/ugnezditve celic/vsaditev celic
AV	JAZBEC, Katerina
SA	ROŽMAN, Primož (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2014
IN	SERIJSKA PRESADITEV KOSTNEGA MOZGA PRI NEOBSEVANIH MIŠIH BALB/C
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 86, 16 pregl., 38 sl., 1 pril., 132 vir.
IJ	sl
JI	sl / en
AI	Večina raziskovalcev pri presaditvah celic kostnega mozga (KM) uporablja mieloablativne postopke, ki so po splošno razširjeni dogmi nujni za uspešno vsaditev presajenih celic. Temelj našega dela je bil nekaj več kot ducat študij, pri katerih so vsaditev uspešno dosegli tudi pri nekondicioniranih mišjih prejemnicah. Naš namen je bil izbrati najprimernejšo metodo za izolacijo celic KM, doseči vsaditev darovalčevih celic KM pri nekondicioniranih mladih in starih miših BALB/c, ter spremljati, ali zaporedne presaditve povečajo vsaditev pri starih prejemnicah. Za izolacijo celic KM smo primerjali postopka spiranja in trenja ter uporabo encima kolagenaze in dispaze. Spremljali smo tudi učinke različnih postopkov shranjevanja, zamrzovanja, lize eritrocitov in uporabe različnih medijev na kvaliteto presadka. Uspešnost vsaditve darovalčevih celic smo preverjali 1 in 3 mesece po presaditvi z metodo PCR v realnem času, pritrditev po enem dnevu pa smo preverili tudi analizo s PKH26 obarvanih celic na pretočnem citometru. Za najprimernejšo metodo za izolacijo celic KM smo določili postopek trenja kosti, s katerim smo pridobili do 400 milijonov celic, kar je 4-krat več kot pri postopku spiranja kosti. Presaditev je bilo najbolje opraviti takoj po izolaciji celic. Presaditve celic KM niso vodile v zaznavni himerizem oz. so se rezultati himerizma v KM prejemnic gibali v območju do 0,5 %, kar je bilo pod mejo kvantifikacije. S krvnim testom smo potrdili, da so bile celice injicirane v kri. Ugotovili smo, da so pljuča prvo mesto, kjer so se celice ustavile nekaj minut po presaditvi (v pljučih smo zaznali 4,7 % do 8 % darovalčeve DNA, medtem ko je v KM, vranici, jetrih in ledvicah ni bilo). Odsotnost himerizma je lahko posledica zavrnitve celic, pomanjkanja prostora v nišah KM prejemnic in/ali pomanjkanja proliferacije celic, ki prispejo v KM.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 6:616.419(043.2)=163.6
CX bone marrow transplantation/bone marrow/mice/hematopoietic stem cells/cell isolation/bone marrow niche/homing/engraftment
AU JAZBEC, Katerina
AA ROŽMAN, Primož (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2014
TI SERIAL BONE MARROW TRANSPLANTATION IN NON-IRRADIATED BALB/C MICE
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 86, 16 tab., 36 fig., 1 ann., 132 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Most researchers perform bone marrow (BM) transplantations using myeloablative conditioning which, according to prevailing opinion, is essential for the successful engraftment of transplanted cells. Our research was based on a few more than a dozen studies in which successful engraftment was achieved in non-conditioned mice. Our aim was to choose the most suitable method for the isolation of BM cells, to achieve engraftment of donor BM cells in both young and old non-conditioned BALB/c mice, and to observe, if consecutive transplantations lead to greater engraftment in the older recipients. For BM cell isolation, we compared bone flush and bone crush protocols, and the use of collagenase and dispase enzymes. We observed the effects of different storage procedures, freezing, red blood cell lysis, and the use of different isolation mediums, on the quality of cell transplant. The success of engraftment was determined 1 and 3 months after the first transplantation with real-time PCR analysis, and the success of lodgement was also determined after 24 hours using flow cytometry (we dyed the transplanted cells with PKH26). The most suitable method for the isolation of BM cells is the bone crush method, which led to the isolation of up to 400 million cells, which is 4-times more cells than achieved using the bone flush protocol. The best way to perform transplantation was to use freshly isolated cells. Transplantations of BM cells did not lead to detectable engraftment, or chimerism only ranged up to 0.5 %, which was below the limit for quantification. We tested peripheral blood to confirm that the donor cells were injected into the blood stream. A few minutes after transplantation, the cells were detectable in the lungs (we detected 4.7 % to 8 % donor DNA, while there was no donor DNA in BM, spleen, liver and kidneys). The lack of chimerism could be due to the rejection of donor cells, lack of space in BM niches in recipients and/or lack of proliferation of cells that lodge in the BM.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
SLOVARČEK	XI
1 UVOD	1
1.1 KOSTNI MOZEG	2
1.2 NIŠE MATIČNIH CELIC V KOSTNEM MOZGU	4
1.3 PRESADITEV KOSTNEGA MOZGA	5
2 PREGLED OBJAV	7
2.1 HIMERIZEM	7
2.2 VSADITEV CELIC V KOSTNI MOZEG	7
2.2.1 Vsaditev celic v KM pri neobsevanih miših	9
2.2.2 Odvisnost vsaditve od količine presajenih celic	11
2.2.3 Pri presaditvah uporabljajo predvsem izbrane (sortirane) celice	12
2.2.4 Uspešnost presaditev	13
2.2.5 Metode zaznavanja celic darovalca pri prejemniku	14
2.2.6 Metode izolacije celic KM iz kosti.....	15
2.2.7 Določitev števila celic KM za presaditev	16
3 CILJI RAZISKAVE.....	17
4 HIPOTEZE	17
5 MATERIAL IN METODE	18
5.1 DOLOČITEV NAJPRIMERNEJŠE METODE ZA IZOLACIJO CELIC KOSTNEGA MOZGA	18
5.1.1 METODA SPIRANJA KOSTI.....	19
5.1.2 METODA TRENJA KOSTI	22
5.2 ŠTETJE CELIC	24
5.2.1 Štetje celic s hemocitometrom	24
5.2.2 Avtomatizirano štetje celic z Vi-CELL XR.....	25
5.3 OPAZOVANJE CELIC Z MIKROSKOPIJO	25
5.4 ZAMRZOVANJE CELIC	25
5.4.1 Zamrzovanje	26
5.4.2 Odmrzovanje.....	26
5.5 SHRANJEVANJE CELIC NA 4 °C IN NA SOBNI TEMPERATURI	27
5.6 LIZA ERITROCITOV	27
5.7 PRETOČNA CITOMETRIJA	28
5.7.1 Uporaba pretočne citometrije.....	29

5.7.1.1 Določanje deleža jedrnih celic in njihove viabilnosti	30
5.7.1.2 Določanje odstotka obarvanih celic KM z barvilom PKH26.....	31
5.8 BARVANJE Z BARVILOM PHK26	31
5.9 PREIZKUS MEDIJEV ZA IZOLACIJO CELIC KM.....	32
5.10 PRESADITEV KOSTNEGA MOZGA	34
5.10.1 Presaditev celic KM v prejemnice BALB/c.....	34
5.10.2 Korekcija priprave presadka	35
5.11 DOLOČITEV USPEŠNOSTI PRESADITVE.....	36
5.11.1 Odvzem vzorcev KM, nekaterih organov in krvi.....	36
5.11.2 Izolacija DNA.....	38
5.11.3 PCR v realnem času (PCR-RČ)	40
5.11.3.1 Potek PCR v realnem času	44
5.11.3.2 Izboljšave PCR v realnem času	45
6 REZULTATI	47
6.1 ŠTEVILO IN VIABILNOST PRIDOBLENIH CELIC KM.....	47
6.2 MORFOLOGIJA PRIDOBLENIH CELIC	48
6.3 REZULTATI ZAMRZNITVE CELIC	49
6.4 ŠTETJE CELIC PO SHRANITVI NA 4°C IN NA SOBNI TEMPERATURI	50
6.5 REZULTATI PRETOČNE CITOMETRIJE	50
6.5.1 Določanje deleža jedrnih celic in njihove viabilnosti	50
6.5.2 Barvanje celic KM z barvilom PKH26.....	51
6.5.3 Določanje deleža jedrnih celic in njihove viabilnosti po lizi eritrocitov	53
6.5.4 Test medijev za izolacijo celic KM.....	54
6.5.5 Korekcija priprave presadka	56
6.6 REZULTATI PRESADITEV CELIC KM	57
6.6.1 Presaditev celic KM v skupini mladih miši BALB/c.....	57
6.6.2 Presaditev KM v skupini starih prejemnic BALB/c	60
6.6.3 Rezultati izolacije DNA.....	60
6.6.4 Rezultati analize s PCR v realnem času	62
7 RAZPRAVA IN SKLEPI	69
7.1 RAZPRAVA	69
7.2 PRIHODNJE DELO	74
7.3 SKLEPI	74
8 POVZETEK.....	75
9 VIRI.....	77
9.1 Citirani viri	77
9.2 Drugi viri	85
ZAHVALA	
PRILOGA: PROTOKOL TRENJA KOSTI ZA PRIDOBITEV CELIC KOSTNEGA MOZGA	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1.1: Potencialne bolezni, pri katerih si obetamo uspeh z zdravljenjem z MC (Šimc in sod., 2011, str. 637, tabela 2, prirejeno po Mimeault in Batra, 2006), med katerimi so MC zarodka, MC ploda (v plodu in popkovnični krvi) in MC odraslega (v KM in vseh drugih tkivih).	1
Pregl. 2.2.1.1: Izbor nekaterih raziskav, kjer so uspešno dosegli himerizem pri neobsevanih prejemnicah seva BALB/c. Presadili so celice darovalcev moškega spola prejemnicam ženskega spola.	10
Pregl. 2.2.2.1: Celokupno število celic KM pri različnih sevih miši, starosti 8 tednov (Colvin in sod., 2004, tabela 1, str. 578)	11
Pregl. 5.11.3.1: Priprava vzorcev za umeritveno krivuljo	44
Pregl. 5.11.3.2.1: Priprava vdolbinic za PCR-RČ na plošči z 384 vdolbinicami	46
Pregl. 5.11.3.2.2: Nastavitev ciklov na inštrumentu za PCR Viia™ 7	46
Pregl. 6.3.1: Število celic pred in po odmrznitvi	49
Pregl. 6.5.3.1: Analiza celičnih suspenzij KM po opravljeni lizi eritrocitov v različnih časovnih okvirih	53
Pregl. 6.5.3.2: Štetje celic KM z Vi-CELL pred in po postopku lize eritrocitov in po postopku spiranja (vključuje enkratno centrifugiranje in spiranje)	54
Pregl. 6.5.4.1: Primerjava števila celic in viabilnosti pri izolaciji celic z različnimi mediji (izmerjeno z Vi-CELL)	55
Pregl. 6.6.1.1: Rezultat presaditve celic KM mladih darovalcev (starosti 7 do 9 tednov) pri šestih mladih prejemnicah BALB/c (starosti od 15 do 19 tednov na dan prve presaditve). V preglednici so podani rezultati dvakratne analize istih vzorcev.	58
Pregl. 6.6.1.2: Rezultat presaditve celic KM mladih darovalcev (starosti 7 do 9 tednov) pri starih prejemnicah BALB/c (starosti 15 mesecev na dan prve presaditve). V preglednici so podani rezultati dvakratne analize istih vzorcev.	59
Pregl. 6.6.1.3: Odstotek moške DNA v periferni krvi prejemnic po presaditvi celic KM. Prejemnicam smo vzeli vzorce periferne krvi (po 70 µl), jih združili v bazene ter iz bazenov krvi izolirali DNA. Vzorce smo morali združiti v bazene, ker bi posamezni vzorci vsebovali premajhno količino DNA za uspešno analizo.	60
Pregl. 6.6.3.1: Rezultati izolacije DNA v vzorcih	61
Pregl. 6.6.4.1: Naklon (S) in učinkovitost (E) PCR-RČ	64
Pregl. 6.6.4.2: Primer izračuna vrednosti za postavitev umeritvene krivulje in test dobljene formule za izračun znanih vrednosti moške DNA v vzorcih (PCR-RČ z dne 20. 08. 2014)	66

KAZALO SLIK

Sl. 1.1.2: Razvoj različnih celic iz multipotentne matične celice kostnega mozga.....	3
Sl. 2.2.1: Ugnezditve, pritrditve in vsaditve krvotvornih matičnih celic	8
Sl. 2.2.2.1: Odstotek celokupnega števila celic KM, izoliranih iz posameznih kosti	11
Sl. 2.2.2.2: Celice darovalca izpodrinejo celice prejemnika ali pa zasedejo prazne niše ...	12
Sl. 2.2.3.1: Ločevanje celic KM s pomočjo različnih označevalcev pri miših in človeku. Znak minus (-) pomeni negativno selekcijo, znak plus (+) pomeni pozitivno selekcijo (prirejeno po Doulatov in sod., 2012, str. 124, sl. 2).....	13
Sl. 2.2.5.1: Primerjava modelov neobsevanih in obsevanih prejemnikov glede na zmožnost zaznave	15
Sl. 5.1.1.1: Videz kosti po čiščenju (levo). Spiranje kostnega mozga iz kosti (desno; foto: Mojca Jež).	21
Sl. 5.1.2.1: Trenje kosti s pestilom v terilniku (levo). Po trenju ostanejo delci kosti, ki so zelo svetli (desno).....	24
Sl. 5.2.2.1: Zajeta slika zaslona pri štetju celic in določanju viabilnosti z napravo Vi-CELL XR.	25
Sl. 5.7.1: Prednje sipanje (FSC).....	28
Sl. 5.7.2: Stransko sipanje (SSC).....	28
Sl. 5.7.3: Shema pretočnega citometra s pretočno komoro, optičnim sistemom in elektronskim sistemom (Fuchs, 2014).	29
Sl. 5.7.1.1: Analiza celic KM s pretočnim citometrom.....	30
Sl. 5.9.1: Kombiniranje celic, izoliranih v različnih medijih, dveh osebkov (M 30 in M 13).	33
Sl. 5.10.1: Idejna zasnova poskusa presaditve kostnega mozga (PKM).	34
Sl. 5.10.1.1: Injiciranje presadka v repno veno.	35
Sl. 5.11.3.1: Potek PCR v realnem času.....	41
Sl. 5.11.3.2: PCR-RČ s SYBR GREEN.....	41
Sl. 5.11.3.3: Graf pomnoževanja. (Life technologies, 2012: 3)	42
Sl. 5.11.3.4: A) Disociacijske krivulje več vzorcev z različnimi odstotki moške DNA (vrh pri 78,5°C nakazuje pomnoževanje Zfy1, medtem ko vrh pri 88,5°C nakazuje pomnoževanje Bcl2). Krivulje pomnoževanja več vzorcev z različnimi odstotki DNA za Bcl2 (B) in Zfy1 (C).	43
Sl. 6.2.1: Mikroskopski posnetki pripravkov izoliranih celic KM, posneti z mikroskopom Nikon ECLIPSE Ti-S in programom NIS-Elements D.....	48
Sl. 6.2.2: Pri postopku trenja je zelo pomembno celično suspenzijo vsaj dvakrat dobro prefiltrirati skozi 40 µm-sito (levo), tik pred prenosom v brizgo pa še skozi 30 µm-sito (desno; Miltenyi Biotec).....	49
Sl. 6.3.1: Mikroskopski posnetki celic po odmrznitvi.....	49

Sl. 6.4.1: Število živih celic KM po enem, dveh treh in devetih dneh v mediju RPMI+....	50
Sl. 6.5.1.1: Sliki na levi strani prikazujeta analizo celic KM, pridobljenih s spiranjem kosti, sliki na desni pa prikazujeta analizo celic KM, pridobljenih s trenjem kosti. Zgornji sliki prikazujeta jedrne celice v označenem območju R1 glede na vse izolirane celice KM. Pri postopku spiranja je jedrnih celic 67,2 %, pri postopku trenja pa 50,5 %. Spodnji sliki prikazujeta viabilnost le jedrnih celic, ki je v obeh primerih nad 90 %.	51
Sl. 6.5.2.2: Analiza celic KM s pretočnim citometrom po barvanju s PKH26 pred presaditvijo. S PKH26 smo pobarvali 59,3 % celic KM ženskega spola (levo) in 59,7 % celic KM moškega spola (desno).	52
Sl. 6.5.2.3: Analiza celic KM s pretočnim citometrom 24 ur po presaditvi 10,6 milijonov celic KM darovalke ženskega spola in 13,1 milijonov celic KM darovalca moškega spola, ki so bile obarvane s PKH26. V KM prejemnice M 3 smo zaznali 1,9 % obarvanih celic moškega darovalca (desno) in 2,9 % obarvanih celic ženske darovalke v KM prejemnice M 4 (levo).	52
Sl. 6.5.3.1: Določanje viabilnosti celotnega vzorca brez vrat. Viabilnost (desno) pretočni citometer meri v celotnem kvadratu (levo), ne le v vratih R1.	54
Sl. 6.5.4.1: Ko medij vsebuje heparin, se celična suspenzija slabo meša s PBS in je zelo lepljiva/gostljata (levo). Podobno zlepljanje v kosme smo opazili tudi pri centrifugiranju in spiranju (desno, modra puščica).	55
Sl. 6.5.5.1: Analiza pripravljenega presadka celic KM po lizi eritrocitov in filtriranju z Miltenyi sitom.	56
Sl. 6.6.4.1: Krivulje pomnoževanja pri Zfy1 (levo) in Bcl2 (desno).	63
Sl. 6.6.4.2: Disociacijske krivulje pri Zfy1 (levo) in Bcl2 (desno).	63
Sl. 6.6.4.3: Krivulje pomnoževanja pri testu različnih koncentracij ZO	64
Sl. 6.6.4.4: Rezultati testa učinkovitosti za Zfy1 in Bcl2.	65
Sl. 6.6.4.5: Umeritvena krivulja znanih vrednosti odstotkov moške DNA.	65
Sl. 6.6.4.6: Disociacijske krivulje za Zfy1 in Bcl2.	67
Sl. 6.6.4.7: Grafa pomnoževanja vseh vzorcev pri PCR-RČ z dne 20. 08. 2014	67
Sl. 6.6.4.8: Disociacijske krivulje za Zfy1 in Bcl2 za vse vzorce z dne 20. 08. 2014.	67

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CFU	kolonijska enota (angl. <i>colony-forming unit</i>)
CFU-E	kolonijska enota, ki vodi v nastanek eritrocitov
CFU-GM	kolonijska enota, ki vodi v nastanek granulocitov in monocitov
CFU-Meg	kolonijska enota, ki vodi v nastanek megakariocitov
CXCL12	kemotaktični citokin
CXCR4	receptor za CXCL12
FACS	ločevalnik fluorescenčno označenih celic (angl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FBS	zarodni telečji serum (angl. <i>fetal bovine serum</i>)
FISH	fluorescenčna hibridizacija <i>in situ</i> (angl. <i>fluorescence in situ hybridization</i>)
GVHD	reakcija presadka proti gostitelju (angl. <i>graft-versus-host disease</i>)
HLA	humani levkocitni antigen (angl. <i>human leukocyte antigen</i>)
KM	kostni mozeg
KMC	krvotvorna matična celica
MC	matična celica
MHC	poglavitni histokompatibilni kompleks (angl. <i>major histocompatibility complex</i>)
PBS	fosfatni pufer (angl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PCR-RČ	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
PKH26	fluorescenčno barvilo

SLOVARČEK (z dopolnitvami prirejeno po Rožman in Jež, 2010)

celice CAR (angl. <i>CXCL12-abundant reticular cells</i>)	Celice v kostnem mozgu, ki v velikem številu izražajo CXCL12.
citafereza	Proces odstranitve določenih celičnih sestavin iz krvi.
diferenciacija celic	Proces, v katerem se manj specializirana celica razvije v bolj specializirano.
endost	Endost je prehodno območje med kostjo in kostnim mozgom, ki vključuje osteoblaste (celice, ki gradijo kost) in osteoklaste (celice, ki kost razgrajujejo).
hematopoeza	Proces tvorjenja krvnih celic iz krvotvornih matičnih celic, ki poteka v kostnem mozgu. Zdrava odrasla oseba tvori dnevno več kot sto milijard krvnih celic, da lahko vzdržuje stalno število eritrocitov, levkocitov in trombocitov v krvnem obtoku.
himerizem	Pojav, ko je organizem sestavljen iz celic, ki izhajajo iz dveh ali več različnih zigot. Najpogostejši himerizem je krvni, ki nastane pri dvojčkih zaradi intrauterine zamenjave krvotvornega tkiva. Pri odraslih poznamo tudi transfuzijske in transplantacijske himere, to so osebe, ki so prejele transfuzijo tuje krvi ali presadek alogenskega dajalca celic, tkiv ali organa.
humoralni dejavniki	Dejavniki, ki so povezani s telesnimi tekočinami (na primer, hormoni ali protitelesa, ki krožijo v telesnih tekočinah).
matična celica (MC)	Nediferencirana celica v živih bitjih, ki ima dve ključni lastnosti: lastnost samoobnavljanja in lastnost pluripotentnosti. MC se samoobnavlja z nesimetrično delitvijo, pri čemer nastane ena njej enaka in druga, bolj diferencirana hčerinska celica. Ta ima manjši razvojni potencial od prve, ker je bolj diferencirana. Samoobnavljanje omogoča vzdrževanje populacije matičnih celic v konstantnem številu.
mieloablativno in nemieloablativno kondicioniranje	Postopek, ki uniči kostni mozeg z obsevanjem ali s tretiranjem s kemoterapevtskimi sredstvi. Če se kostni mozeg uniči v celoti, temu pravimo mieloablativno, če pa le delno, se imenuje nemieloablativno kondicioniranje.
multipotentna matična celica (MMC)	Celica z manjšo potentnostjo in sposobnostjo diferenciacije v primerjavi s pluripotentno. Multipotentna celica lahko tvori različne tipe celic, ki pa vsi pripadajo istemu kličnemu listu. Večina tkivno specifičnih matičnih celic iz odraslih tkiv je multipotentnih. Primer: krvotvorna matična celica.
kostni mozeg (KM)	Močno ožiljeno vezivno tkivo v mikroskopskih prostorih gobastega kostnega tkiva, kjer nastaja veliko število celic in se odvija izjemen spekter celičnih diferenciacij. V glavnem je prisoten v ploščatih kosteh (rebra, prsnica in lobanja), kosteh nepravilnih oblik (vretenca in medenične kosti), dolgih kosteh (proksimalna epifiza stegenice, golenice, nadlahtnice) in nekaterih kratkih kosteh.

krvotvorna matična celica (KMC)	Multipotentna matična celica v kostnem mozgu, iz katere nastanejo eritrociti, levkociti in trombociti.
poglavitni histokompatibilni kompleks (MHC)	Področje v genomu sesalcev, ki kodira površinske antigene na celicah, ki sodelujejo pri imunskem odzivu. MHC je pomemben pri ločevanju lastnih molekul od tujih. Pri človeku se MHC imenuje HLA.
presadek	Celice, tkivo ali organ darovalca, ki ga presadimo v telo prejemnika.
pritrnitev (angl. <i>lodgement</i>)	Proces, pri katerem se celice pritrdijo v niše kostnega mozga (časovno sledi ugnezditvi).
označevalec (marker)	V celični biologiji uporabljamo ta izraz za genotipske (določeni specifični geni) ali fenotipske (določene specifične beljakovine) označevalce, ki so značilni za določen tip celic. Lahko so na površini celice, v citoplazmi ali v celičnem jedru. Na podlagi njihovega izražanja lahko prepoznamo določeno vrsto celic pa tudi določeno patološko dogajanje v njih.
pluripotentna matična celica	Celica, sposobna tvoriti vse telesne celice, vključno z germinalnimi celicami. Primer so embrionalne matične celice.
prekursorska celica, tudi celica prednica	Izraz za vsako delečo se celico, ki se lahko razdeli in diferencira v vsaj dve različni hčerinski celici. V citologiji je prekursorska celica sinonim za delno diferencirano, običajno unipotentno celico, ki je izgubila večino multipotentnosti matičnih celic. Sposobna je diferenciacije v eno ali dve končni obliki.
pretočni citometer	Naprava, ki lahko hitro ločuje fluorescenčno označene celice v suspenziji glede na njihovo velikost ali barvo, s katero so označene. Uporabljamo jo za štetje določenih vrst celic ali za njihovo sortiranje.
progenitorska celica, predniška celica	Hčerinska celica, usmerjena potomka matične celice v direktni liniji. Je že delno diferencirana celica, ki je lahko tudi materinska celica različnim, bolj diferenciranim celičnim tipom celic. Iz nje nastanejo nove celice po seriji celičnih delitev.
reakcija presadka proti gostitelju (GVHR)	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.
ugnezditev, tudi prijemanje, vraščanje, zadrževanje (angl. <i>homing</i>)	Proces, ki poteče v prvih nekaj urah po presaditvi celic kostnega mozga in pomeni prihod celic v kostni mozeg ter prečkanje krvno-endotelijske bariere.
vsaditev (angl. <i>engraftment</i>)	Proces, ko se celice pritrdijo v kostni mozeg in pričnejo ustvarjati zrele krvne celice in se samoobnavljati. Vsaditev lahko traja nekaj dni do nekaj tednov (kratkotrajna) in več mesecev, tudi let (dolgotrajna).
stroma	Del kostnega mozga, ki ni neposredno povezan s hematopoezo, temveč pri njej sodeluje posredno, tako da ustvarja primerno mikrookolje za matične in progenitorske celice.

1 UVOD

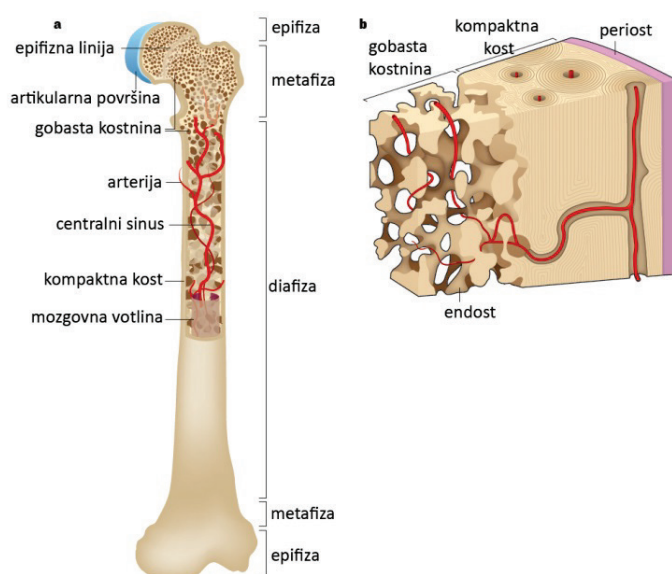
Miši so pred več kot šestimi desetletji postale pomemben model za raziskovalne študije, ki vključujejo presaditev kostnega mozga (KM). Čeprav so miši manjše, imajo krajšo življenjsko dobo, s človekom delijo več kot 95 % genoma in obolevajo za enakimi boleznimi (Arber in sod., 2013), zato lahko rezultate, pridobljene na mišjih modelih, z veliko uspešnostjo prenašamo na terapije pri človeku, vključno s področjem presaditve kostnega mozga. Ena izmed glavnih prelomnic pri transplantacijah je bila odkritje pglavitnega histokompatibilnega kompleksa (MHC) in s tem povezanega tipiziranja HLA (angl. *human leukocyte antigen*). Odkritja na mišjih modelih so vodila v danes rutinsko izvajanje presaditev kostnega mozga (oz. krvotvornih matičnih celic), s katerimi zdravijo že več kot sedemdesetih malignih in nemalignih bolezni, med njimi akutne mieloične levkemije, kronične mieloične levkemije, akutne limfoblastne levkemije, Hodgkinovega limfoma, talasemije, aplastične anemije itd. Zadnja leta so v porastu študije, ki se osredotočajo na napredna zdravljenja in celične terapije, med katerimi so tudi presaditve matičnih in progenitorskih celic v regenerativne namene (preglednica 1.1).

Preglednica 1.1: Potencialne bolezni, pri katerih si obetamo uspeh z zdravljenjem z MC (Šimc in sod., 2011, str. 637, tabela 2, prirejeno po Mimeault in Batra, 2006), med katerimi so MC zarodka, MC ploda (v plodu in popkovnični krvi) in MC odraslega (v KM in vseh drugih tkivih).

AVTOIMUNSKÉ BOLEZNI Ankilozirajoči spondilitis Avtoimunska hemolitična anemija Avtoimunska trombocitopenična purpura Sladkorna bolezen (tip I) Goodpasture sindrom Gravesova bolezen Hashimotov tiroiditis Miastenija gravis Pemfigus vulgaris Perniciozna anemija Revmatska vročica Spontana neplodnost Krioglobulinemija Revmatoidni artritis Sistemiški lupus erythematosus Multipla skleroza	SOLIDNI TUMORJI Nevroblastom Rak dojke Tumorji spolnih celic Možganski tumorji Sarkom mehkih tkiv Ewinov sarkom Rak ovarijev Rak pljuč Wilmsov tumor Osteosarkom Rak ledvic Retinoblastom	KRVNE IN IMUNSKÉ BOLEZNI Mielodisplastični sindromi Mieloproliferativne bolezni Defekti KMC Fagocitne bolezni Histiocitne bolezni Dedne bolezni trombocitov Dedne bolezni eritrocitov Dedne okvare metabolizma Dedne bolezni imunskega sistema Levkemije Limfoproliferativne bolezni Bolezni plazmatk
	BOLEZNI ŽIVČEVJA Alzheimerjeva bolezen Parkinsonova bolezen Huntingtonova bolezen Bolezni motoričnega nevrona Bolezni perifernega živca Možganska kap Poškodbe hrbtenjače	POŠKODBE Opekline Celjenje ran, mehkih in opornih tkiv Slabo celjeni zlomi kosti
JETRNE BOLEZNI Ciroza	PLEŠAVOST	BOLEZNI KOSTI Prirojene bolezni kosti
BOLEZNI PLJUČ KOPB Emfizem Pljučna fibroza Bronhopulmonalna displazija Pljučna hipertenzija	KARDIOVASKULARNE BOLEZNI Akutni miokardni infarkt Kardiomiopatija	OČESNE BOLEZNI Bolezni mrežnice Makularna degeneracija Kemične opekline
NEPLODNOST Motena spermatogeneza in oogeneza	GENSKE BOLEZNI Cistična fibroza Epidermolysis bullosa	MIŠIČNE BOLEZNI Mišične distrofije Metabolne bolezni mišic

1.1 KOSTNI MOZEG

Kostni mozeg je dinamično okolje, kjer nastaja veliko število celic in kjer se odvija izjemen spekter celičnih diferenciacij. Je močno ožiljeno vezivno tkivo v mikroskopskih prostorih gobastega kostnega tkiva. V glavnem je prisoten v ploščatih kosteh (rebra, prsnica in lobanja), dolgih kosteh (proksimalna epifiza stegenice, golenice, nadlahtnice), vretencih, medeničnih kosteh in nekaterih kratkih kosteh (Tortora in Derrickson, 2014). Kostni mozeg ne vsebuje tipičnih kapilar, temveč žile, imenovane sinusoidi, ki so lahko tudi do petkrat širše od kapilar. V endoteliju teh sinusoid so številne odprtine in med samimi celicami vrzeli, kar omogoča enostavno prehajanje krvnih celic in plazemskih proteinov v kri ter iz krvi v KM (Unglaub Silverthorn, 2013, Ellis in sod., 2011).



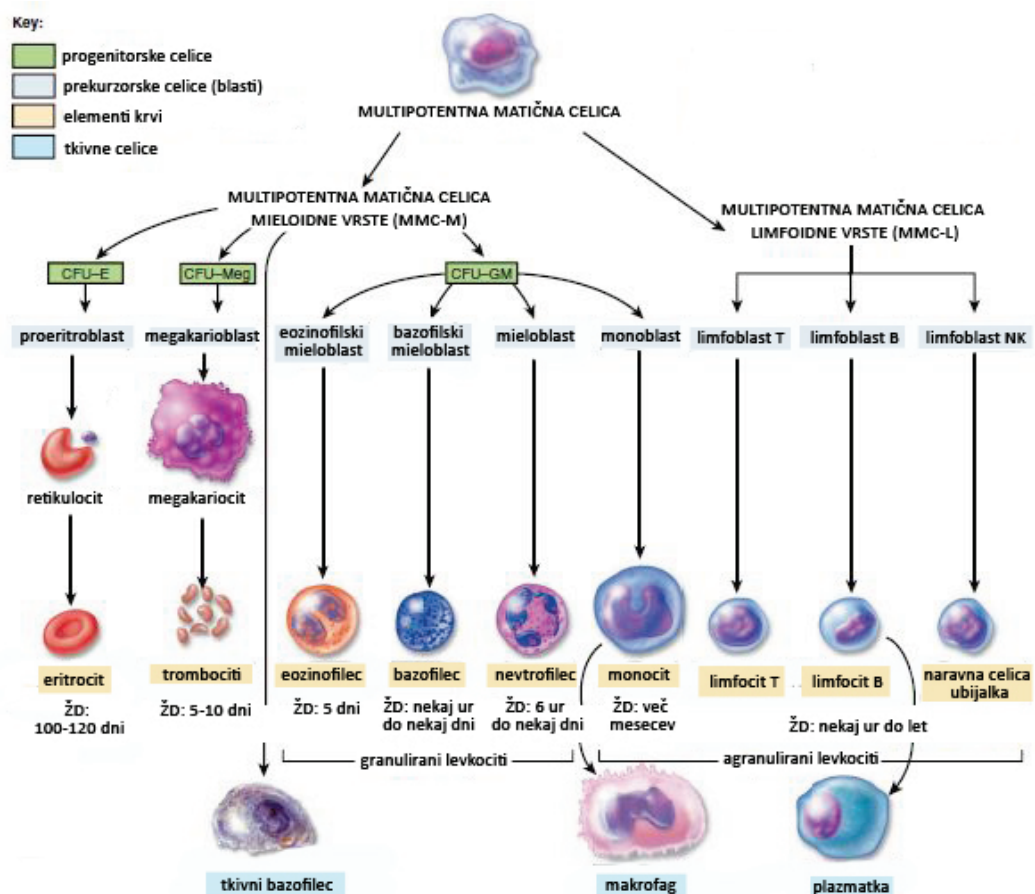
Slika 1.1.1: Zgradba kosti (prirejeno po Morrison in Scadden, 2014, str. 328, sl. 1)

Zadnje tri mesece pred rojstvom postane kostni mozeg glavno mesto nastajanja krvnih celic – hematopoeze. Proces hematopoeze je nenehen, saj celice v krvi živijo le nekaj ur (levkociti), dni (trombociti) ali tednov (eritrociti), le nekateri limfociti tudi več let (slika 1.1.2). Sistem negativne povratne zanke nadzoruje skupno število eritrocitov in trombocitov v krvnem obtoku (ki mora biti stalno), število levkocitov pa je odvisno od potreb imunskega sistema, ki se odziva na vdor patogenov in drugih tujih antigenov.

Krvne celice pri človeku nastajajo iz krvotvornih matičnih celic (KMC), ki jih je v KM 1–1,5 na 10.000 vseh celic, v periferni krvi pa 1 na 100.000 vseh krvnih celic. KMC so mezodermalnega izvora. Sposobne so se samoobnavljati ter diferencirati v različne vrste celic (slika 1.1.2). Organizirane so v kompleksno razvojno hierarhijo in se med seboj ločijo po potentnosti in številnih površinskih označevalcih (Jež, 2008). Sprva ustvarjajo dve vrsti matičnih celic, iz katerih se nato naprej lahko razvija več vrst celic: multipotentne matične celice mieloične vrste (MMC-M) in multipotentne matične celice limfatične vrste (MMC-L). Iz MMC-M se v KM razvijejo eritrociti, trombociti, monociti, nevtrofilci, eozinofilci, bazofilci in tkivni bazofilci. Iz MMC-L se razvijejo naravne celice ubijalke in limfociti, ki dozoriijo šele v limfatičnem tkivu. Ko celice nastanejo, potujejo skozi sinusoidi in druge

krvne žile ter zapustijo KM. Po izplavitvi iz KM se nastale krvničke, z izjemo limfocitov, ne delijo več.

Med hematopoezo se večina MMC-M diferencira v progenitorske celice, ostale MMC-M in MMC-L pa se diferencirajo neposredno v prekurzorske celice. Progenitorske celice se niso več zmožne samoobnavljati in so zavezane k nastanku bolj specifičnih krvnih elementov. Nekatere so znane pod kratico CFU (angl. *colony-forming unit*), na primer, CFU-E vodijo v nastanek eritrocitov, CFU-Meg vodijo v nastanek megakariocitov in CFU-GM vodijo v nastanek granulocitov in monocitov (slika 1.1.2). Prekurzorske celice (blasti) so celice naslednje generacije in iz njih se preko nekaj delitev razvijejo končni elementi krvi, na primer, monoblasti se razvijejo v monocite, eozinofilski mieloblasti se razvijejo v eozinofile itd. Nekatere matične celice lahko ustvarjajo tudi osteoblaste, hondroblaste in mišične celice. Retikularne celice sintetizirajo retikularna vlakna, ki ustvarjajo stromo, ki podpira celice rdečega kostnega mozga.



Slika 1.1.2: Razvoj različnih celic iz multipotentne matične celice kostnega mozga. CFU (angl. *colony forming unit*) so progenitorske celice. CFU-E vodijo v nastanek eritrocitov, CFU-Meg vodijo v nastanek megakariocitov in CFU-GM v nastanek granulocitov in monocitov (prirejeno po Tortora in Derrickson, 2014, str. 666, sl. 19.3).

S starostjo organizma nastajanje krvnih celic upade in rdeči kostni mozeg v sredici dolgih kosti nadomesti rumen kostni mozeg, ki ga večinoma gradijo maščobne celice (adipociti). Rumeni kostni mozeg se lahko spremeni nazaj v rdečega, ko KMC migrirajo iz rdečega v

rumen kostni mozeg ter se tam množijo in diferencirajo (Tortora in Derrickson, 2014). Pri miših večina kostnih votlin ohrani rdeči kostni mozeg skozi celotno življenje (Russel in Bernstein, 2014). Če periferni deli telesa potrebujejo večjo količino krvnih celic kot jih zmore ustvariti kostni mozeg, prične hematopoeza potekati tudi v tkivih izven kostnega mozga, v jetrih in vranici (Fox in sod., 2007).

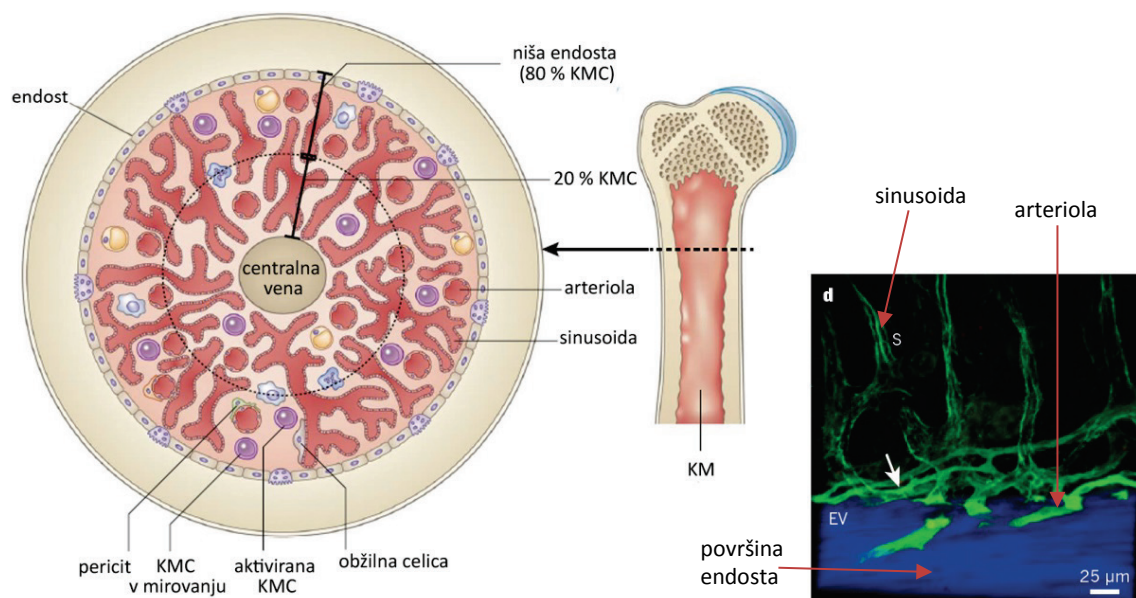
1.2 NIŠE MATIČNIH CELIC V KOSTNEM MOZGU

Niša matičnih celic je specifično mikrookolje z definiranimi anatomskimi in funkcionalnimi lastnostmi, kjer se matične celice samoobnavljajo in ustvarjajo celice potomke (Yin in Li, 2006). Gradijo jo specifične celice strome in elementi zunajceličnega matriksa in v njej KMC prejemajo in integrirajo regulatorna sporočila sosednjih celic, komponent zunajceličnega matriksa in topnih dejavnikov (Zhong in sod., 2002, Nombela-Arrieta in sod., 2013, Bydlowski in sod., 2013).

Prvi je hipotezo niš leta 1978 predstavil Schofield, s katero je predlagal, da so matične celice povezane z drugimi celicami, ki vplivajo na njihovo samoobnavljanje, proliferacijo in zorenje (Lam in Adams, 2010, cit. po Schofield, 1978). Preučevanje niš KM je bilo dolgo močno oteženo zaradi pomanjkanja tehnik, ki bi omogočale opazovanje posameznih celic v dolgih kosteh *in vivo*, pomanjkanja tehnik slikanja ter kompleksnih celičnih označevalcev, s katerimi bi spremljali redke populacije KMC (Nombela-Arrieta in sod., 2013). Različne raziskave so prišle do različnih zaključkov. *Ex vivo* raziskave so, na primer, kazale na to, da se KMC povezujejo z osteoblasti v območju endosta (Zhang in sod., 2003), medtem ko so *in vivo* raziskave kasneje pokazale, da so KMC v distalnih regijah KM v neposrednem stiku s sinusoidami in perisinusoidnimi populacijami celic strome, kjer jih vzdržujejo različne vrste celic, ne samo osteoblasti (Ding in sod., 2012). Ali gre v resnici za eno ali več niš in kako natančno KMC vzajemno delujejo z ostalimi celicami niše bo jasno šele v prihodnosti. Glede na to, da so že same KMC heterogene, je možno, da za vsako subpopulacijo KMC obstajajo tudi različne niše (Morrison in Scadden, 2014).

Novejše študije kažejo na to, da so celice v širšem območju regije endosta¹ (niša endosta, angl. *endosteal niche*, slika 1.2.1; Mendelson in Frenette, 2014), predvsem v mikrookolju gostega ožlja in z ožiljem povezanimi celicami. Arteriole in periciti, ki so bližje endostu, naj bi predstavljali arteriolarno nišo (angl. *arteriolar niche*), ki spodbuja mirovanje KMC, medtem ko naj bi sinusoide in obžilne celice ustvarjale sinusoidno nišo (angl. *sinusoid niche*), ki ima pomembno vlogo pri proliferaciji in migriranju KMC. Na arteriolno in sinusoidno nišo se pogosto nanašajo tudi s skupnim imenom vaskularna niša (angl. *vascular niche*).

¹ V preteklih študijah so območje endosta definirali s širino 12 celic oz. 100 µm od kosti, tridimenzionalno slikanje pa je pokazalo, da so KMC v veliko večjem območju endosta.



Slika 1.2.1: (Levo) Niša KMC v razširjenem območju endosta, kjer je okoli 80 % KMC, preostalih 20 % je območju, ki se približuje centralni veni (prirejeno po Mendelson in Frenette, 2014, str. 839, sl. 2). (Desno) Prečni prerez, ki prikazuje, kako arteriole potekajo vzdolž površine endosta (EV). Bela puščica prikazuje prehod v sinusoido (S), ki se stekajo proti centralni veni (Nombela-Arrieta in sod., 2013, str. 537, sl. 3).

1.3 PRESADITEV KOSTNEGA MOZGA

Idejo o presaditvi kostnega mozga so razvili v začetku petdesetih let prejšnjega stoletja, ko so preučevali učinke obsevanja na glodavcih. Ugotovili so, da lahko žival pred smrtjo reši zaščita vranice ali kosti pri obsevanju, ali pa vsaditev kostnega mozga darovalca po njem (Reddy in sod., 2008, cit. po Jacobson in sod., 1950, in Lorenz in sod., 1951). Sprva so mislili, da so bili za ugodne učinke po presaditvi kostnega mozga po obsevanju odgovorni humoralni dejavniki, a so leta 1956 dokazali, da so se v KM prejemnika vsadile celice darovalca (Reddy in sod., 2008, cit. po Ford in sod., 1956).

Till in McCulloch sta v svojih objavah v letih 1963 in 1964 prva prepoznala obstoj KMC (Schmitt in sod., 2014, cit. po Becker in sod., 1963, Siminovitch in sod., 1964, Till in sod., 1964a in 1964b, McCulloch in sod., 1964). Medtem ko so drugi prej že dokazali sposobnost proliferacije krvotvornih celic, sta Till in McCulloch ugotovila, da presaditev KM v obsevane miši vodi v nastanek kolonije mieloičnih in eritroidnih celic v njihovih vranicah ter da število kolonij sovpada s številom presajenih celic. Ti poskusi so pokazali, da klonska namnožitev celic KM reši življenje obsevanim mišim (Domen in sod., 2006, Schmitt in sod., 2014). V tistem času so veliko študij na psih in človeku opravili tudi raziskovalci pod vodstvom dr. E. Donnalla Thomasa, ki je poznan kot »oče presaditev kostnega mozga«. Leta 1990 je za svoje delo prejel Nobelovo nagrado na področju fiziologije ali medicine za razvoj uspešnega zdravljenja levkemije s presaditvijo KM (NIH, 2012).

Z razvojem pretočne citometrije so pričeli ločevati posamezne celične populacije na podlagi kombinacij različnih površinskih označevalcev. V začetku so presajali celoten KM ali KM, obogaten s KMC, sčasoma pa so vedno pogostejše postale presaditve krvotvornih

matičnih in progenitorskih celic, ki jih pridobijo iz mobilizirane periferne krvi. Naprava, skozi katero teče darovalčeva kri, ujame te celice na podlagi površinskih označevalcev (Domen in sod., 2006). Med KMC pri miših so tako imenovane dolgotrajne KMC (angl. *long-term (LT) stem cells*), srednjetrojne (angl. *intermediate-term (IT) stem cells*) KMC in kratkotrajne KMC (angl. *short-term (ST) stem cells*) (Doulatov in sod., 2012). Dolgotrajne KMC so tiste prave matične celice, ki se lahko samoobnavljajo in podpirajo krvotvorni sistem skozi celotno življenje prejemnika, kratkotrajne KMC so že bolj diferencirane, se manj samoobnavljajo in lahko ustvarjajo mieloične in limfatične celice le nekaj tednov, srednjetrojne pa so nekje vmes. Pri presaditvah so običajno najbolj zaželenne dolgotrajne KMC. Ker danes presajajo večinoma KMC in ne vseh celic KM, se presaditev KM (BMT, angl. *bone marrow transplantation*) sedaj bolj pravilno imenuje presaditev KMC (HSCT, angl. *hematopoietic stem cell transplantation*).

V splošnem so presaditve lahko avtologne ali alogenske. Avtologne presaditve pomenijo presaditev bolnikovih lastnih celic KM, alogenske presaditve pa vključujejo presaditev celic KM drugega posameznika, ki ni genetsko identičen (izjema so enojajčni dvojčki, kar se pogosto obravnava kot singenska presaditev). Da bi bile presaditve alogenskih darovalcev uspešne, se mora presadek s prejemnikom čim bolj ujeman v MHC. Če ujemanja ni, lahko pride do zavrnitve presadka ali do reakcije presadka proti gostitelju (GVHR, angl. *graft-versus-host reaction*) in bolezni presadka proti gostitelju (GVHD, angl. *graft-versus-host disease*).

Pred presaditvijo prejemnike pogosto obsevajo ali jih tretirajo s kemoterapevtskimi sredstvi (mieloablativna terapija). Namen tega je poleg zdravljenja same bolezni (na primer, levkemije) tudi zaviranje imunskega sistema, kar posledično prepreči zavrnitev presajenih celic. S tem se uniči prejemnikov KM (ablacija), ostala tkiva pa utrpijo le minimalne poškodbe. V nekaterih primerih bolniki prejmejo le delno obsevanje ali kemoterapijo (nemieloablativna terapija). S tem uničijo le del KM prejemnika in po presaditvi pride do stanja mešanega himerizma. Darovalčeve KMC spodbudijo tudi učinek presadka proti tumorju (GVT, angl. *graft versus tumor effect*), ker pa je možna tudi reakcija presadka proti gostitelju, mora bolnik prejemati imunosupresivna sredstva (Domen in sod., 2006, Wikipedia, 2014b). Ker mieloablativna terapija uniči imunski sistem bolnika in je za zdravljenje nujno potrebna dolga hospitalizacija in sterilni pogoji, je postala nemieloablativna terapija področje intenzivnega raziskovanja (Domen in sod., 2006, ZTM, 2014a).

Avtologne presaditve KMC so trenutno namenjene zdravljenju manjšega števila malignih bolezni (na primer, plazmocitom ali limfom), v bodoče pa pričakujemo, da jih bodo uporabljali za številna druga bolezenska stanja in s starostjo povezana obolenja. Med tovrstna napredna zdravljenja sodi zdravljenje srčnega popuščanja s presaditvijo KMC (Vrtovec in Poglajen, 2011, Vrtovec, 2014).

Pri raziskavah presaditev KM na miših se raziskovalci v želji po doseganju himerizma večinoma odločajo za mieloablativno (ali nemieloablativno) kondicioniranje. Z obsevanjem ali kemoterapijo opravijo trajno (ali začasno) supresijo imunskega sistema ter sprostitev niš v KM, kar naredi prostor za vsaditev darovalčevih matičnih celic (Duran-Struuck in Dysko, 2009). V nekaj študijah pa so uspešno dosegli vsaditev KM tudi pri

nekondicioniranih miših (Micklem in sod., 1968, Brecher in sod., 1982, Saxe in sod., 1984, Sadelain in Wegman, 1989, Stewart in sod., 1993, Wu in Keating, 1993, Ramshaw in sod., 1995a in 1995b, Nilsson in sod., 1997 in 1999, Rao in sod., 1997, Blomberg in sod., 1998, Bubnic in Keating, 2002, Colvin in sod., 2004 in 2007; mnogi od teh pod vodstvom dr. Petra Quesenberryja), in te študije so bile podlaga za naš pilotski poskus. Presaditev krvotvornih celic v nekondicionirane prejemnike lahko v določenih okoliščinah ponuja pomembne klinične prednosti, saj se lahko izognemo morebitnim resnim zapletom, ki so povezani s citotoksičnim kondicioniranjem (Bubnic in Keating, 2002).

2 PREGLED OBJAV

2.1 HIMERIZEM

Himera je bila v grški mitologiji pošast z levjo glavo, kozjim trupom in zmajevim repom, v moderni presaditvi alogenskih matičnih celic pa himera oz. himerizem predstavlja prisotnost darovalčevih krvotvornih in limfatičnih celic v prejemnikovem organizmu. Če po presaditvah KM vse krvotvorne in limfatične celice v prejemniku izvirajo od darovalca, govorimo o popolnem himerizmu, če pa so prisotne celice tako darovalca kot prejemnika, govorimo o mešanem himerizmu (Shimoni in Nagler, 2001).

Mešani himerizem se lahko ustvari le kot dinamično ravnovesje med gostiteljevimi in darovalčevimi krvotvornimi celicami, pri katerem mora obstajati obojestranska toleranca (Shimoni in Nagler, 2001) – med seboj si morata biti do določene mere tkivno skladna oz. histokompatibilna. Bolj so MHC antigeni podobni, večja je histokompatibilnost in večja je verjetnost, da ne bo prišlo do zavrnitve presadka ali reakcije presadka proti gostitelju (Tortora in Derrickson, 2014).

2.2 VSADITEV CELIC V KOSTNI MOZEG

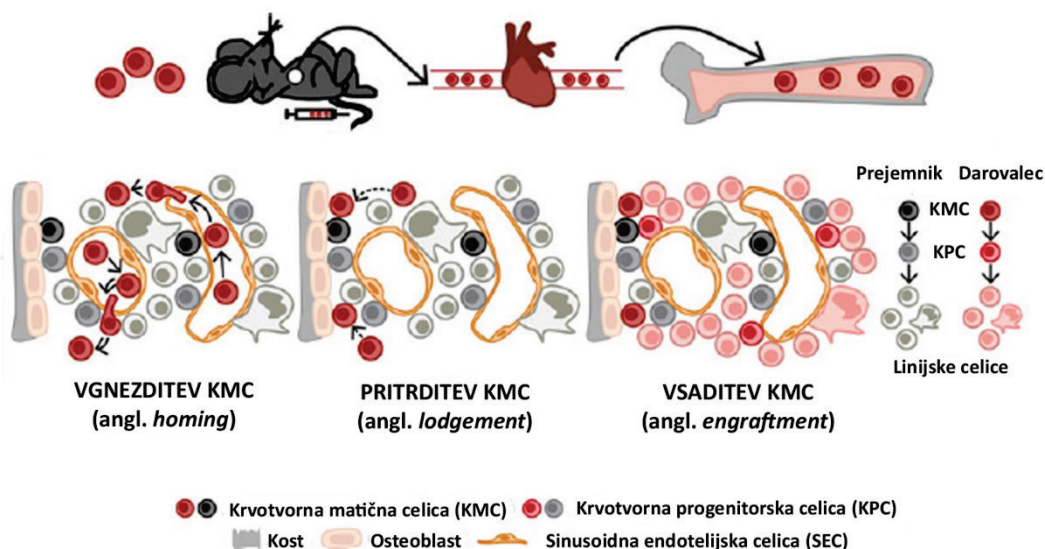
KMC, ki so v nišah KM, pod vplivom različnih notranjih in zunanjih dejavnikov lahko ostajajo v mirovanju, se samoobnavljajo, diferencirajo v zrele krvne celice, preidejo v apoptozo ali mobilizirajo v krvni obtok. Periferna obtočila dosežejo z endogeno mobilizacijo, inducirano mobilizacijo ali s postopkom presaditve (Heazlewood in sod., 2014). Prvi proces po presaditvi celic KM je prihod celic v KM in prečkanje krvno-endotelijske bariere KM, kar se imenuje ugnezditve² (angl. *homing*; Lapidot in sod., 2005). Pri procesu ugnezditve presajene celice na tarčna mesta v KM-u pripeljejo kemoatraktanti. Celice se preko svojih receptorjev na svoji površini vežejo z ligandi endotelija žil ter nato migrirajo preko sten žil v zunajžilni prostor KM. Pri ugnezditvi matičnih in progenitorskih celic v KM sodelujejo številni faktorji (VCAM-1, $\alpha 4\beta 1$ integrin, CD44, HA, E-/L-/P-selektini, ...), še posebej pa je pomembna interakcija med receptorjem CXCR4, ki ga izražajo matične in progenitorske celice, in ligandom CXCL12, ki ga v velikem številu izražajo celice CAR³ v KM (Heazlewood in sod., 2014, Sugiyama in sod., 2006). Ellis in

² V slovenskih publikacijah se pojavljajo še izrazi prijemanje, vraščanje in zadrževanje.

³ Celice CAR (angl. *CXCL12-abundant reticular cells*) so retikularne celice v nišah KM. Obdajajo endotelijske celice sinusoid ali pa so poleg endosta.

sod. (2011) so ugotovili, da se presajene krvotvorne matične in progenitorske celice preferenčno ugnezdiijo v metafize, bogate z gobastim tkivom.

Ko celice preidejo v zunajžilni prostor, sledi proces njihove pritrditve (angl. *lodgement*) znotraj posebnih niš KM (Heazlewood in sod., 2014). Ugotovili so, da se s KMC obogatene populacije celic raje pritrdijo v regije endosta, medtem ko se bolj zrele celice pritrdijo v centralna območja KM (Nilsson in sod., 2001). Ko so KMC pritrjene, pričnejo ustvarjati linije zrelih krvnih celic ter množiti same sebe. Temu procesu pravimo vsaditev (angl. *engraftment*) in lahko poteka nekaj tednov do nekaj mesecev (kratkotrajna vsaditev) ali več mesecev (dolgotrajna vsaditev; Lapidot in sod., 2005). Znak vsaditve je, da se v periferni krvi pojavljajo zrele celice, ki so nastale v KM in so darovalčevega porekla. V hematološkem besednjaku pri presaditvah KM človeku običajno govorimo o vseh procesih pod izrazom vsaditev.



Slika 2.2.1: Ugnezditev, pritrditev in vsaditev krvotvornih matičnih celic (povzeto po Heazlewood in sod., 2014, str. 120, sl.1). Pri intravenozni presaditvi celic KM matične in progenitorske celice obtočila dostavijo do KM. Ugnezditev: celice darovalca pridejo v stik s sinusoidnimi endotelijskimi celicami (SEC) in po seriji adhezijskih kaskadnih dogodkov transendotelno migrirajo v zunajžilne prostore KM. Pritrditev: celice migrirajo po ekstravaskularnem prostoru KM in se usidrajo v specifične regije KM. Vsaditev: ko so celice pritrjene, KMC darovalca pričnejo ustvarjati zrele krvne celice ter pričnejo naseljevati bazen KMC.

Ugnezditev poteka od 0 do 6 ur (Askenasy in sod., 2003), a lahko doseže plato že po eni uri (Cerny in sod., 2002, Colvin in sod., 2007). Pritrditev celic poteka od 0 do 3 dni. Pritrjene celice v KM po vsej verjetnosti sprva pridejo v stik s hranljivimi elementi strome, ki jih podpira, nato pa pridejo do točke, ki odloča, ali se bodo delile ali prešle v mirovanje (Askenasy in sod., 2003). Nilsson in sod. (1997a) so ugotovili, da celice lahko preidejo v S-fazo delitve že 12 ur po presaditvi. Po 4 ali 5 dneh potomke pritrjenih celic migrirajo v bolj centralne regije epifize in postopoma naselijo diafizo (Askenasy in sod., 2003).

Matične celice se v splošnem lahko ugnezdiijo tudi v druge organe (še posebej v odzivu na stresne signale, ki jih telo oddaja, na primer, pri obsevanju celega telesa) in lahko pred vsaditvijo v KM sprva migrirajo, na primer, v vranico (Lapidot in sod., 2005). Da se

presajene celice KM ne ustavijo le v KM, temveč tudi v drugih organih, so pokazali Cui in sod. (1999), ki so spremljali celice 4 in 24 ur po presaditvi obsevanim in neobsevanim prejemnicam. Celice so se, poleg v KM, ustavile tudi v vranici, jetrih, ledvicah, pljučih in mišicah ter po njihovem mnenju v prvih 24 urah niso kazale specifičnosti za krvotvorna okolja.

V splošnem velja, da brez dobre ugnezditev ni kasnejše dobre vsaditve, vendar včasih za vsaditev tudi to ni dovolj, saj ugnezdene celice lahko umrejo, se delijo ali preselijo (Cerny in sod., 2002).

2.2.1 Vsaditev celic v KM pri neobsevanih miših

Dolgo časa je veljalo, da je lahko dolgotrajna presaditev celic KM uspešna le s predhodno mieloablacijo, ki naj bi omogočila, da se matične celice vsadijo v sproščene niše KM (Quesenberry in sod., 2005, Zhong in sod., 2002). Micklem in sod. (1968) so bili verjetno prvi, ki so poskusili zaznati kromosomsko označene celice KM v nekondicioniranih CBA miših in so 3 mesece po presaditvi 20 milijonov celic zaznali nizek himerizem, do največ 8,5 % (Nilsson in sod., 1997b, cit. po Micklem in sod., 1968). Tudi poskusi Takade in sod. leta 1971 (Nilsson in sod. 1997b, cit. po Takada in sod., 1971a, 1971b) so pokazali le nizko število kromosomsko označenih celic, presajenih v CBA miši.

Od osemdesetih let dalje se je zvrstilo nekaj več kot ducat raziskav, ki so pokazale, da je s presaditvijo celic KM zdravim prejemnicam možno doseči do 40 % himerizem, pri posameznih prejemnicah celo do 88 %. Brecher in sod. (1982) so po presaditvi 200 milijonov celic KM dosegli 16–26 % vsaditev. Saxe in sod. (1984) so dosegli 0–16 % vsaditev, ki se ni razlikovala, če so celice presadili mladim ali odraslim prejemnicam. Stewart in sod. (1993) so dosegli 5–46 % vsaditev. Ramshaw in sod. (1995a in 1995b) so presadili 120, 200 ali 350 milijonov celic ter dosegli tudi do $53\% \pm 7\%$ vsaditev. Nilsson in sod. (1997, 1999) po presaditvi 100 milijonov ter 120–180 milijonov celic KM zaznali $24.9 \pm 1.9\%$ ter $19.2 \pm 2.9\%$ do $31.3 \pm 2.5\%$ vsaditev. Rao in sod. (1997) so spremljali uspešnost presaditve pri različnih odmerkih do 200 milijonov celic ter pri tem dosegli do $39 \pm 5,7\%$ himerizem. Vsaditev na milijon celic je bila najboljša v prvih dveh dneh presaditve, ki je potekala pet dni zapovrstjo, ter ko so pet dni zapovrstjo presadili po 10 milijonov celic, sicer pa je v splošnem veljalo, da več kot so celic presadili, boljša je bila vsaditev in ni bilo videti, da bi vsaditev dosegla plato. Pri posameznih miših so dosegli tudi do 79 % vsaditev.

Medtem ko Rao in sod. (1997) platoja pri presaditvi do 200 milijonov celic niso zasledili, pa so Blomberg in sod. (1998) plato dosegli, in sicer s presaditvijo kar 800 milijonov celic (20 doz po 40 milijonov celic). Povprečno so prejemnice dosegle 40,4 % himerizem, pri posameznih miših pa vse od 19 do 88 %, kar je podobno kot pri presaditvi 200 milijonov celic.

Nekateri so spremljali prisotnost darovalčevih celic, poleg v KM, tudi v drugih organih in v periferni krvi. Bubnic in Keating (2002) sta presadila 20 milijonov enojedrnih celic⁴ ter zaznala 2,4 do 5,4% himerizem v KM prejemnic ter 1,2 do 3% himerizem v periferni krvi, medtem ko nekateri drugi raziskovalci himerizma v periferni krvi niso zaznali (Sadelain in Wegman, 1989, Bubnic in Keating, 2002, cit. po Wu in Keating, 1993). Ramshaw in sod. (1995a in 1995b), Rao in sod. (1997) in Blomberg in sod. (1998) so spremljali vsaditev v vranici in priželjcu ter ugotovili, da je bila vsaditev običajno nižja kot v KM.

Ker se je pokazalo, da je vsaditev različna pri različnih sevih miši, Stewart in sod. (1993) predvidevajo, da so lahko med različnimi sevi miši genetske razlike in s tem razlike v zmožnosti naselitve celic v nekondicioniran KM. V preglednici 2.2.1.1 je podanih nekaj raziskav, ki so potekale na sevu BALB/c in pri katerih so presadili celice mladih darovalcev moškega spola mladim prejemnicam ženskega spola.

Preglednica 2.2.1.1: Izbor nekaterih raziskav, kjer so uspešno dosegli himerizem pri neobsevanih prejemnicah seva BALB/c. Presadili so celice darovalcev moškega spola prejemnicam ženskega spola.

Avtorji	Število presajenih celic KM	Čas po presaditvi	Odstotek celic darovalca v prejemnicah
Stewart in sod., 1993	40 x 10 ⁶ na dan, 5 dni zapovrstjo 30 x 10 ⁶ ali 40 x 10 ⁶ 5 x 10 ⁶ na dan, 5 dni zapovrstjo	2-6 tednov 25 mesecev 7 tednov in 6 mesecev 2, 4, 6 in 64 tednov	10-18,3 % 15-42 % 0 % 0 %
Ramshaw in sod., 1995a	celice 2 golenic in 2 stegnenic na dan, 5 dni zapovrstjo (= skupaj okoli 350 x 10 ⁶)	10 tednov	27 ± 2 %
Ramshaw in sod., 1995b	200 x 10 ⁶ 200 x 10 ⁶ (razdeljeno v 5 doz) 200 x 10 ⁶ (razdeljeno v 10 doz) 120 x 10 ⁶ 120 x 10 ⁶ (razdeljeno v 5 doz) 120 x 10 ⁶ (razdeljeno v 10 doz)	7 do 10 tednov	22 ± 2 % 23 ± 2 % 26 ± 3 % 13 ± 2 % 9 ± 1 % 11 ± 2 %
Nilsson in sod., 1997b	100 x 10 ⁶	6 tednov	24.9 ± 1.9 %
Rao in sod., 1997	40 x 10 ⁶ 40 x 10 ⁶ , 2 dni zapovrstjo 40 x 10 ⁶ , 3 dni zapovrstjo 40 x 10 ⁶ , 4 dni zapovrstjo 40 x 10 ⁶ , 5 dni zapovrstjo 2,5, 5, 10, 20 ali 40 x 10 ⁶ , 5 dni zapovrstjo	20-25 tednov	11 ± 0,83 % 20 ± 2 %, 23 ± 2,5 %, 32 ± 6,3 %, 39 ± 5,7 % od 3 ± 0,6 % do 39 ± 5,7 %
Blomberg in sod., 1998	40 x 10 ⁶ , 20 dni zapovrstjo 2 x 10 ⁶ , 20 dni zapovrstjo	5-7 tednov	40,4 ± 6,8 % (19-88 %) 4,3 ± 1,4 % (0-9,1 %)
Nilsson in sod., 1999	120-180 x 10 ⁶ , v eni ali treh dozah	6 tednov in 6 mesecev	19.2 ± 2.9 do 31.3 ± 2.5%
Bubnic in Keating, 2002	20 x 10 ⁶ enojedrnih celic	do 27 tednov	2,4-5,4% (zaznali tudi v krvi: 1,2-3,0%)
Colvin in sod., 2004	40 x 10 ⁶	8 tednov	6,91 ± 0,4%

⁴ Celice KM brez eritrocitov in granulocitov, ki vsebujejo različne populacije zrelih celic, progenitorskih celic in nizek delež KMC.

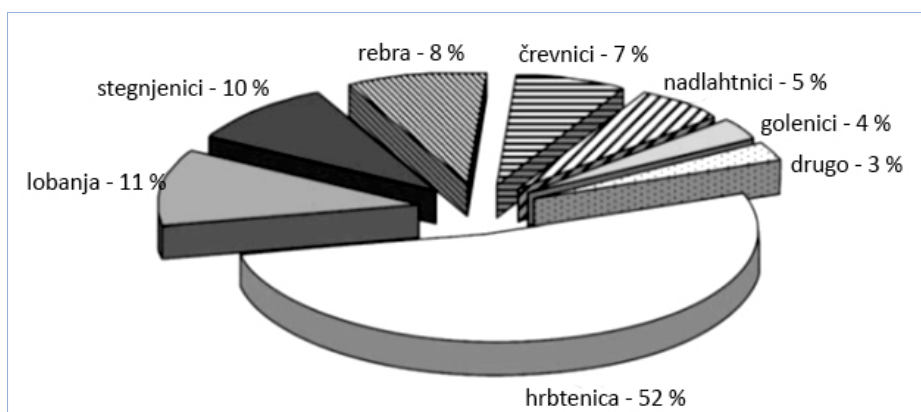
2.2.2 Odvisnost vsaditve od količine presajenih celic

Mnenja, ali je vsaditev celic linearno odvisna od odmerka presajenih celic, so različna. Nekateri jasne linearne odvisnosti ne zaznajo (Saxe in sod., 1984), drugi pa jo (Brecher in sod., 1982, Rao in sod., 1997, Bubnic in Keating, 2002, Colvin in sod., 2004). Na milijon presajenih celic naj bi dosegli od 0,17 % do 0,27 % ali celo do 0,52 % vsaditev.

Odvisnosti vsaditve od količine presajenih celic so se posvetili Colvin in sod. (2004), ki so skušali natančno določiti koeficient korelacije. S tem namenom so trem sevom miši (BALB/c, C57/BLK in DBA/2) določili število celic v celotnem kostnem mozgu (preglednica 2.2.2.1). S postopkom trenja so določili število celic v hrbtenici, lobanji, rebrih, stegenicah, golenicah in črevnicah ter ostalih kosteh (slika 2.2.2.1). Pri sevu BALB/c so ugotovili, da ima samica povprečno 556 milijonov celic KM in samec povprečno 450 milijonov celic KM. Ugotovili so tudi, da je več kot polovica celic KM v vretencih.

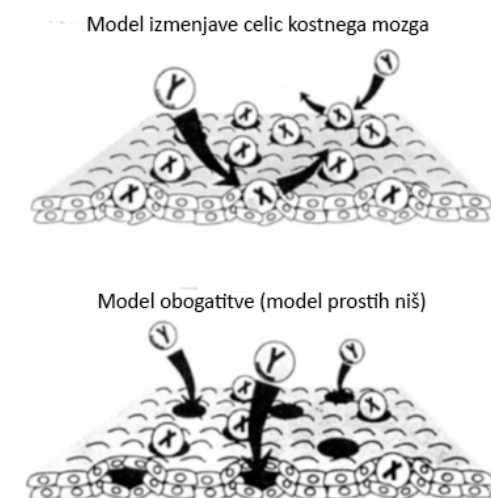
Preglednica 2.2.2.1: Celokupno število celic KM pri različnih sevih miši, starosti 8 tednov (Colvin in sod., 2004, tabela 1, str. 578)

Sev	Spol	Starost (tednov)	Število	Število celic	Stand. napaka aritmetične sredine
BALB/c	ženski	8	5	566×10^6	73×10^6
BALB/c	moški	8	5	450×10^6	58×10^6
C57/BLK	moški	8	5	466×10^6	48×10^6
DBA/2	moški	8	5	284×10^6	34×10^6



Slika 2.2.2.1: Odstotek celokupnega števila celic KM, izoliranih iz posameznih kosti (prirejeno po Colvin in sod., 2004, slika 1, str. 577).

Colvin je s sodelavci izračunal, kolikšna naj bi bila teoretična vsaditev pri nekondicioniranem prejemniku po presaditvi 40 milijonov celic. Pri modelu izmenjave KM (angl. *replacement model*) naj bi darovalčeve celice KM izpodrinile celice prejemnika, pri modelu obogatitve (angl. *augmentation model*) pa naj bi celice povečale število celic v KM (slika 2.2.4). Ob predpostavki, da je povprečno število celic KM 530 milijonov celic, so teoretično izračunali, da bi pri prvem modelu lahko dosegli 7,5 % vsaditev ter pri drugem 7 % vsaditev. Ko so preučili 72 nekondicioniranih samic, ki so prejele 40 milijonov celic, so pri 8 tednih po presaditvi dobili $6,91 \pm 0,4$ %.



Slika 2.2.2.2: Celice darovalca izpodrinejo celice prejemnika ali pa zasedejo prazne niše (prirejeno po Stewart in sod., 1993, str. 2570, slika 4)

Ker so Ramshaw in sod. (1995) po presaditvi 200 milijonov celic ter Blomberg in sod. (1998) po presaditvi 800 milijonov celic ugotovili, da se ni povečalo skupno število celic KM, niti ne število progenitorskih celic, Colvin in sod. (2004) sklepajo, da je pravi model po vsej verjetnosti model izmenjave, ne pa dodajanja oz. obogatitve, in da matične celice na nek način tekmujejo za svoj prostor v KM.

2.2.3 Pri presaditvah uporabljajo predvsem izbrane (sortirane) celice

V zgoraj omenjenih raziskavah so večinoma presajali vse celice iz KM (vse celice, ki so jih dobili s postopkom spiranja ali trenja kosti, torej jedrne celice in eritrocite), medtem ko so z razvojem metodologij vedno boljšega ločevanja (sortiranja) celic avtorji prešli na presajanje le izbranih celic. Z razvojem pretočne citometrije in monoklonskih protiteles vedno bolj uspešno prepoznavajo in ločujejo KMC, saj imajo celice na površini specifične molekule.

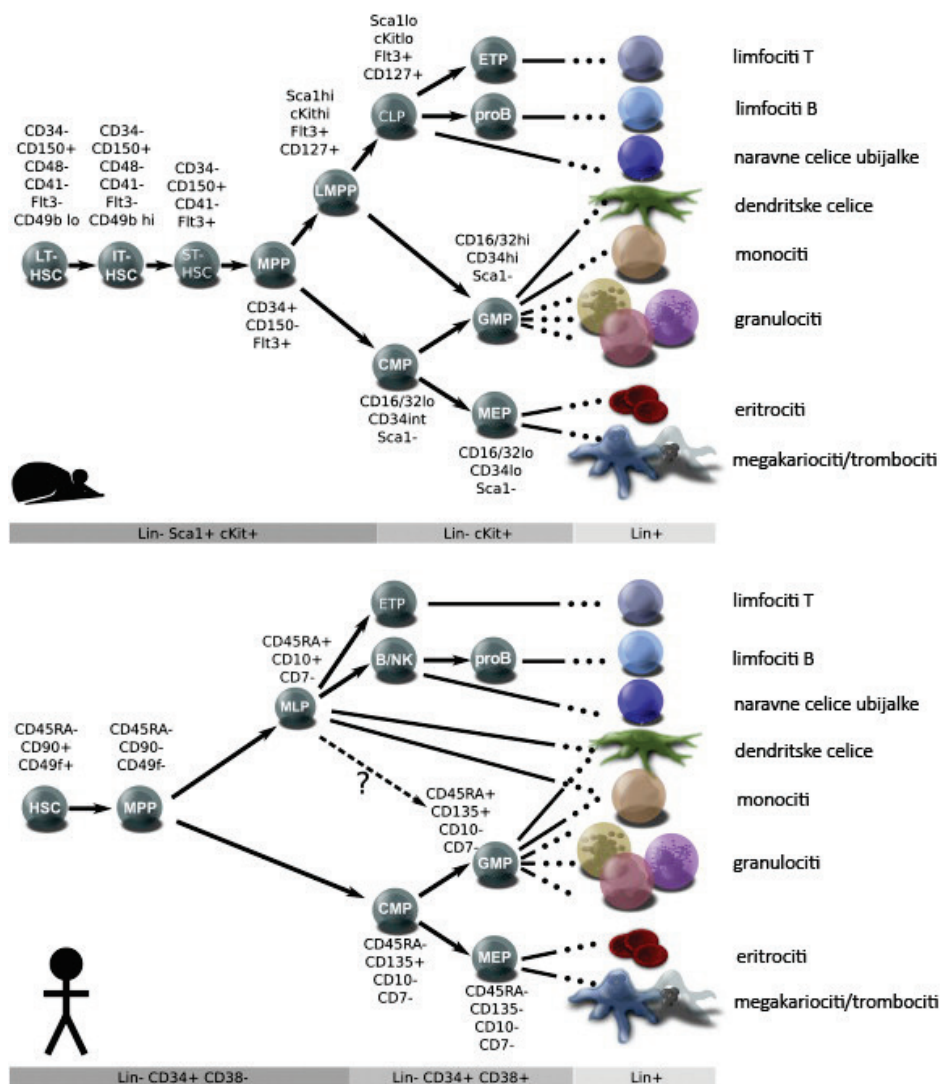
Čeprav ne kaže, da bi obstajal en sam označevalec, ki bi lahko ločil KMC od ostalih krvotvornih celic, se lahko KMC ločuje z multiparametrično pretočno citometrijo. Razvili so kombinacije različnih protiteles, s katerimi želijo pridobiti predvsem dolgotrajne, večlinijske KMC (Challen in sod., 2008). Pri miših skoraj vse vsebujejo pozitivno selekcijo za označevalce c-Kit in Sca-1 ter negativno selekcijo za označevalce zrelih krvotvornih celičnih linij. Označevalci za pozitivno selekcijo so običajno B220 za limfocite B, CD4 in CD8 za limfocite T, Mac-1 za mieloične celice, Ter-119 za eritrocite itd. (Bersenev, 2009). Omenjeno selekcijo označevalcev označujemo kot $c\text{-Kit}^+ \text{Lin}^- \text{Sca}^+$ (KLS⁵) in z njo pridobimo krvotvorne matične in progenitorske celice.

Za boljšo vsaditev celic raziskovalci neredko v presadek dodajajo še nerazporejene celice KM, saj te izboljšajo odstotek vsaditve. Pri neobsevani singenski presaditvi so poleg matičnih celic potrebne tudi celice »nematične populacije, ki omogočajo vsaditev«

⁵ Pogosto se uporablja tudi kratica LSK.

(Nilsson in sod., 2007). Ena od njih so osteoblasti, progenitorske celice kosti (El-Badri in sod., 1998).

Pri človeku za ločevanje KMC uporabljamo druge označevalce (slika 2.2.3.1).



Slika 2.2.3.1: Ločevanje celic KM s pomočjo različnih označevalcev pri miših in človeku. Znak minus (-) pomeni negativno selekcijo, znak plus (+) pomeni pozitivno selekcijo (prirejeno po Doulatov in sod., 2012, str. 124, sl. 2).

2.2.4 Uspešnost presaditev

Kolikšen je odstotek himerizma pri neobsevanih miših, ki ga lahko ocenimo kot uspešnega, ni najbolj jasno, saj so raziskovalci različno uspešni oz. neuspešni pri doseganju ugnezditev, pritrditev in vsaditev celic KM. Številne raziskave so pokazale, da je uspešnost vsaditve večja pri obsevanih prejemnikih (Heazlewood in sod., 2014), medtem ko so Hendrikx in sod. (1996) pokazali, da je ugnezditev v KM neobsevanih prejemnikov 2,5-krat večja kot v KM obsevanih. Zaradi tovrstnih zelo raznolikih rezultatov je uspešnost presaditev težko definirati oz. določiti. Ugnezditev, pritrditev in vsaditev je potrebno

ocenjevati individualno, dobljenih rezultatov pa se ne da posploševati (Heazlewood in sod., 2014), saj se pri izvedbi presaditev različnih študij razlikujejo sevi miši, vrsta uporabljenih celic v presadku (vse celice KM, enojedrne celice, sortirane KMC, ...), načini postopka izolacije celic, prisotnost kondicioniranja, načini detekcije celic darovalca itd., zato je rezultate težko primerjati med seboj.

V mnogih primerih je pri nekondicioniranih prejemnikih lahko opaziti zelo skromno vsaditev, kar nekateri razlagajo kot neuspešne nekondicionirane presaditve (Bubnic in Keating, 2002). Kljub temu, da dosegajo nizke ali celo neznane vsaditve, nekateri spremljajo učinke presaditev KM na prejemnike. Selesinemi in sod. (2009) so, na primer, preučevali uspešnost vpliva presaditve KM na rodnost miši. Presadili so 15–30 milijonov enojedrnh celic in po 2 do 4 tednih zaznali $0,8 \pm 0,2$ % himerizem, če pa so omenjeno dozo presadili 15-krat (enkrat mesečno), so v KM zaznali $7,6 \pm 1,3$ % himerizem. Kljub nizkemu himerizmu so dokazali pozitiven vpliv presajenih celic na rodnost, saj se je povečala starost prejemnic, ko so še kotile, poleg tega pa se je zelo povečalo preživetje mladičev, ki so jih skotile stare miši. Podobno so Kovina in sod. (2013) s presaditvami KM uspeli doseči podaljšanje življenjske dobe prejemnic, pri tem pa himerizma niso določili.

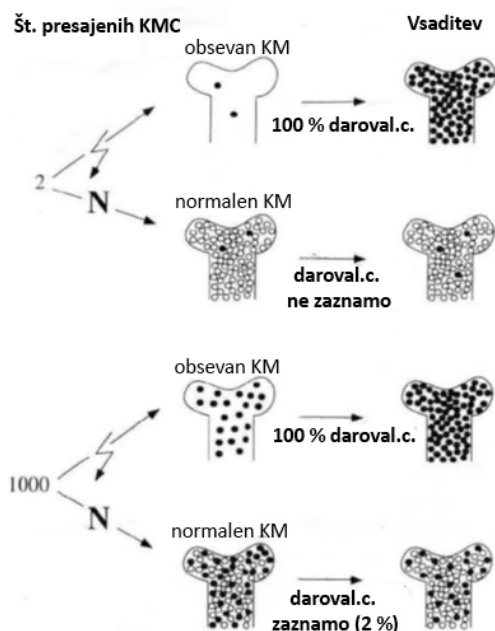
Sadelain in Wegmann sta leta 1989 preučevala, kaj se zgodi s celicami darovalca v primerih, ko je presaditev celic KM v nekondicionirane prejemnike neuspešna. Presadila sta 15 milijonov jedrnih celic brez limfocitov T in spremljala vsaditev mieloične progenitorske celice granulocitno-monocitne vrste (CFU-GM). Sama presaditev ni vodila v himerizem, ki bi ga lahko zaznali, ko pa so po 5, 10, 15 ali 32 dneh s specifičnimi monoklonskimi protitelesi uničili gostiteljeve celice v KM, je to vodilo v skoraj popolni himerizem. S temi rezultati sta podprla idejo, da so po presaditvi v nekondicioniranem gostiteljevem KM prisotne primitivne matične celice darovalca, a se ne množijo ali diferencirajo (Sadelain in Wegmann, 1989). Darovalčeve celice torej ostanejo v gostitelju kot nekakšna rezerva, ki jo organizem lahko po potrebi uporabi (Bubnic in Keating, 2002).

2.2.5 Metode zaznavanja celic darovalca pri prejemniku

Raziskovalci za spremljanje celic darovalca v prejemnikih uporabljajo raznolike načine detekcije, ki so povezani s trajanjem poskusa, zahtevnostjo spremljanja, stroški in razvojem same tehnologije na splošno. Skupina Quesenberryja, ki je bila na prehodu stoletja pri doseganju himerizma v neobsevanih prejemnicah najuspešnejša, je za določanje prisotnosti Y-kromosoma moških darovalcev presajenih v ženske prejemnice uporabljala metodo prenosa po Southernu in metodo fluorescenčne hibridizacije *in situ*, FISH, pri čemer so uporabili hibridizacijski sonde cDNA pY2 in IL-3 (Stewart in sod., 1993, Ramshaw in sod., 1995a in 1995b, Nilsson in sod., 1997a in 1997b, Rao in sod., 1997, Blomberg in sod., 1998, Nilsson in sod., 1999). Danes je za določanje Y-kromosoma bolj primerna metoda PCR v realnem času, ki je specifična in natančna (Peters in sod., 2002, An in Kang, 2013).

Slika 2.2.5.1 prikazuje primerjavo modelov presaditve KMC moških darovalcev v obsevane in neobsevane prejemnice. Pri obsevanih prejemnicah (ki imajo uničeni svoj KM) presaditev darovalčevih celic KM vodi v obnovitev celičnih linij krvi in limfe. Po

okoli 21 dni je celoten KM prejemnik darovalčevega izvora. Pri neobsevanih miših presajene celice darovalca po modelu izmenjave v prejemnicah tekmujejo za svoj prostor. Vsaditev celic vodi v mešani himerizem, ki pa ga lahko zaznamo le, če je bilo presajenih dovolj veliko število celic KM in z njimi KMC ter z dovolj natančno metodo (kot je PCR v realnem času).



Slika 2.2.5.1: Primerjava modelov neobsevanih in obsevanih prejemnikov glede na zmožnost zaznave (prirejeno po Rao in sod., 1997, str. 120, sl. 6).

Za določanje himerizma v prejemnikih se pogosto uporablja kongenske mišje seve CD45.1 in CD45.2 pri miših C57BL/6, ki se razlikujejo v alelu CD45; celice darovalca se od prejemnika ločuje s pretočno citometrijo (Heazlewood in sod., 2014). Za spremljanje s pretočno citometrijo uporabljajo tudi transgenske mišje seve, kot so miši, ki izražajo zeleni fluorescirajoči protein (GFP, angl. *green fluorescent protein*) in rdeči fluorescirajoči protein (RFP, angl. *red fluorescent protein*).

Kadar spremljajo ugnezditev v krajšem časovnem obdobju pa lahko darovane (presajene) celice obarvajo s fluorescenčnimi barvili, kot so PKH26, CM-DiI, DiD, CFSE in BrdU (Lanzkron in sod., 1999, Colvin in sod., 2007, Jang in sod., 2011, Hu in sod., 2011, Ude in sod., 2012, Progatezky in sod., 2013, Xiao in sod., 2014).

2.2.6 Metode izolacije celic KM iz kosti

V raziskavah, opravljenih v prejšnjem stoletju, so celice KM večinoma pridobili s spiranjem kosti (Rao in sod., 1997, Blomberg in sod., 1998, Nilsson in sod., 1999 idr.). Šele po objavi Colvina in sod. leta 2004, da je spiranje KM manj učinkovito kot trenje kosti, saj s spiranjem v KM še vedno ostane približno 9 % celic poleg endosta, se je za postopek pridobivanja celic KM s trenjem kosti odločalo vedno več raziskovalcev (Lo Celso in Scadden, 2007, Benton, 2009, Kovina in sod., 2013). Eden od nezanemarljivih

razlogov je tudi ta, da pri postopkih trenja kosti raziskovalci lahko prihranijo tako pri številu uporabljenih miši, kot pri času in denarju (Colvin in sod., 2004).

Haylock in sod. (2007) so primerjali matične celice miši, pridobljene s spiranjem, in matične celice pridobljene s trenjem kosti po spiranju, ter ugotovili, da imajo matične celice KM izolirane iz regije endosta 1,8-krat večji potencial za proliferacijo, se po presaditvi dvakrat bolje ugnezdijo v KM in imajo boljši dolgoročni krvotvorni potencial. To v načelu pomeni, da je trenje boljši način za pridobivanje MC.

2.2.7 Določitev števila celic KM za presaditev

Pri presaditvah, ki potekajo pri zdravljenju človeka, je priporočena količina KMC (pri človeku so to celice CD34⁺) v presadku pri alogenski presaditvi $\geq 2 \times 10^6$ CD34+ celic/kg telesne teže, a večina transplantacijskih centrov zahteva vsaj 4×10^6 CD34+ celic/kg. Priporočena količina KMC pri avtologni presaditvi je $2,5 \times 10^6$ do 5×10^6 / kg telesne teže (ZTM, 2014a).

Pri preračunu doz za potrebe morebitnih bodočih avtolognih presaditev pri človeku 40×10^6 (oz. 120×10^6) celic KM presajenih pri miših sovpada s 14×10^6 (oz. 42×10^6) KMC pri človeku⁶. Pri postopkih citafereze so pri zdravih darovalcih mobilizirali povprečno 279×10^6 KMC (dr. Primož Rožman, marec 2014, neobjavljeno), kar pomeni, da se z eno aferezo pridobi dovolj celic za več doz.

⁶ Med 10.000 celicami KM je ena KMC. 40×10^6 celic KM pri miših torej vsebuje 4000 KMC. Povprečen človek ima 70 kg, kar je 3500-krat več od miši. 4000 KMC krat 3500 je 14×10^6 KMC.

3 CILJI RAZISKAVE

Prvi del raziskave je bil namenjen določitvi najprimernejše metode za izolacijo celic KM iz mišjih darovalcev, s katero bi pripravili presadek s čim večjim številom viabilnih KMC. Pri tem smo spremljali, kakšni so učinki različnih postopkov izolacije, shranjevanja, barvanja, lize eritrocitov, uporabe različnih medijev ipd. na uspešnost priprave dobrega presadka.

Drugi del raziskave je bil namenjen presaditvi izoliranih celic KM mišjih darovalcev v mišje prejemnice, ki pred presaditvijo niso bile podvržene mieloablativnim postopkom, in spremljanju uspešnosti vsaditve celic v KM (angl. *engraftment*). Želeli smo ugotoviti ali zaporedna presaditev celic KM poveča vsaditev presajenih celic, torej vodi v večji himerizem.

4 HIPOTEZE

1. S postopkom trenja kosti mišjih darovalcev pridobimo večje število celic kostnega mozga kot s postopkom spiranja kosti.
2. S presaditvijo 40-ih milijonov celic KM mišjih darovalcev dosežemo 7 % himerizem v KM neobsevanih mišjih prejemnic.
3. S tremi zaporednimi presaditvami dosežemo večji himerizem kot z eno presaditvijo.
4. Največ darovalčevih celic se v prejemnicah vsadi v KM, manj v ostala tkiva.

5 MATERIAL IN METODE

Delo je potekalo na miših BALB/c z dovoljenjem Uprave RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin v okviru projekta »Presaditev kostnega mozga pri heterohronem mišjem modelu« na Zavodu RS za transfuzijsko medicino. Pri projektu so z živalmi rokavale izključno zaposlene osebe, ki imajo dovoljenje za izvajanje poskusov na živalih. V okviru te diplomske naloge je delo potekalo na tkivih neživih živali z namenom priprave celičnih suspenzij za presaditev kostnega mozga in za določitev uspešnosti presaditve.

Pri našem raziskovalnem delu smo z namenom čim večje tkivne skladnosti uporabili singenske miši BALB/c (AnNCrI), ki naj bi imele v splošnem zaradi sokrvnosti MHC skoraj identičen. Ker smo presajali celice KM darovalcev moškega spola v prejemnice ženskega spola, je pomemben podatek tudi ta, da je bil sev uporabljenih miši z MHC haplotipom H2^d. Za slednji haplotip se je pri raziskavah odločilo že več avtorjev, med njimi Nilsson in sod. (1997a, 1997b, 1999) ter Bubnic in Keating (2002), predvsem na podlagi objav Fierza s sod. (1982) ter Silvers in Wachtel (1977), ker naj bi imele miši H2^d zanemarljivo majhno imunoreaktivnost za antigen H-Y (z Y-kromosomom povezana histokompatibilnost).

5.1 DOLOČITEV NAJPRIMERNEJŠE METODE ZA IZOLACIJO CELIC KOSTNEGA MOZGA

Na podlagi preteklih raziskav smo se odločili, da bomo pridobili celice KM na dva načina: prvi je s spiranjem kosti in drugi s trenjem kosti. Pri postopku spiranja kosti smo pričakovali, da bomo pridobili med 50 in 80 milijoni celic KM, morda celo 110 milijonov (izračunano po rezultatih Colvina in sod., 2004), medtem ko smo pri trenju kosti pričakovali več, in sicer med 300 in 400 milijoni celic KM (prav tako po rezultatih, pridobljenih pri miših BALB/c, Colvina in sod., 2004).

Pri primerjavi obeh metod nas ni zanimalo le število pridobljenih celic, temveč tudi kakovost pripravka. Po pregledu literature, člankov, objavljenih protokolov in izkušenj raziskovalcev na medmrežju, smo sestavili dva postopka, v katerih smo združili izkušnje mnogih avtorjev.

5.1.1 METODA SPIRANJA KOSTI

Protokol je povzet po Ramkumar in sod. (2013), vključene so spremembe po avtorjih Lo Celso in Scadden (2007), McGarry (2014), Madaan (2014) ter Duran-Struuck in Dysko (2009).

Material:

- | | |
|---|---|
| a) medij za pridobitev KM (RPMI+): | e) sterilna rezila (2 kosa), škarje (2 kosa) in |
| - RPMI-1640 z dodanim 25 mM HEPES | pincete (2 kosa ukrivljenih in ene ravna) |
| (pH 7,0 – 7,5) in L-glutaminom | f) 5 ml-brizgalke z iglami (inzulinke in |
| (300 mg/l) (PAA) | 18G igle) |
| - 1mM EDTA (0,5 M EDTA Gibco | g) sterilna gaza |
| UltraPure, pH = 8) | h) sterilna podlaga |
| - 2% FBS (fetalni goveji serum) | i) petrijevke (60 mm) in centrifugirke |
| - 1X PenStrep (penicilin (100 E/ml) + | (50 ml) |
| streptomycin (100 µg)) (PenStrep Gibco | j) Pasteurjeve pipete |
| – 10.000 E/ml penicilina in | k) 40 µm-najlonska sita (Falcon) |
| 10.000 µg/ml streptomicina) | l) pipete in konice za pipete s filtrom |
| - heparin (10E/ml) (Braun – 5.000 E/ml) | m) centrifuga s hlajenjem |
| b) PBS in PBS+ (PBS + 2% FBS + heparin | n) kadička z ledom |
| (10 E/ml)) | o) brezprašna komora (laminarij) |
| c) 70% etanol | |
| d) razkužilo Asepsol (5% raztopina) | |

Priprava medijev:

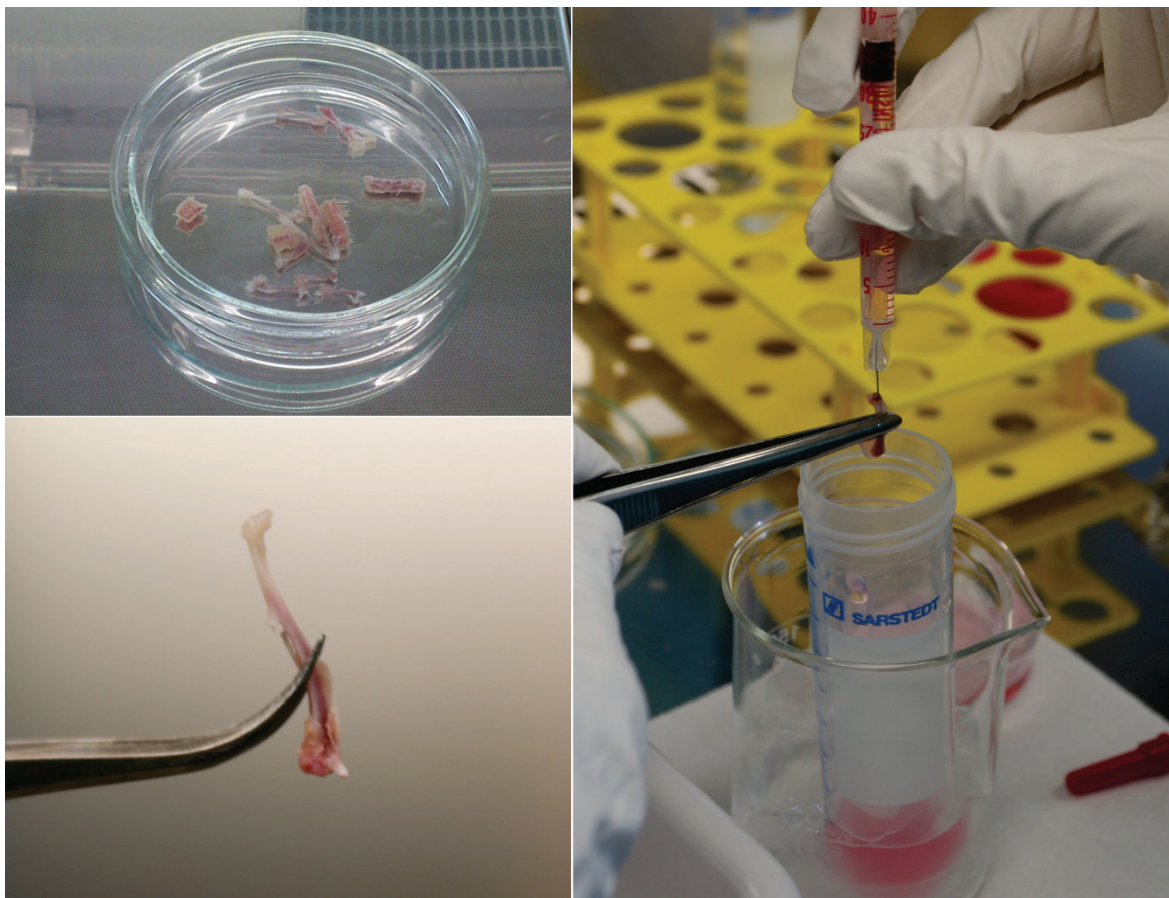
- a) Recept za pripravo 300 ml RPMI+:
- 290 ml RPMI-1640 s HEPES in L-glutaminom
 - 6 ml FBS
 - 3 ml PenStrep
 - 0,6 ml heparina
 - 0,6 ml EDTA
- b) Recept za pripravo 200 ml PBS+:
- 195,6 ml PBS
 - 4 ml FBS
 - 0,4 ml heparin (10 E/ml)

Delo je potekalo v brezprašni komori. Vse uporabljene raztopine in orodje je bilo sterilno. Medije, ki smo jih uporabljali med postopkom, smo postavili v kadičko z ledom. Tudi petrijevke, v katere smo polagali kosti, smo postavili na led.

Postopek:

1. Evtanazirane miši smo za 5 minut potopili v 5 % raztopino Asepsol. Za tem smo jih položili na sterilno podlago. Ves čas ekstrakcije smo vse dobro razkuževali z alkoholom.

2. Kožo smo zarezali na hrbtnem delu in jo s prsti povlekli narazen navzgor in navzdol. *Škarje in pinceto, ki smo ju uporabili za rezanje kože, smo nato zavrgli in pri nadaljnjem delu uporabili svež komplet.*
3. Z rezi smo odstranili glavnih 6 kosti: po dve golenici (*tibia*), stegnenici (*femur*) in nadlahtnici (*humerus*).
4. Golenico smo odstranili tako, da smo zarezali v vezivno tkivo nad kolenom in v mišice pod kolenom. Za tem smo zarezali skozi koleno, ločili golenico in jo nato še potegnili ven iz kože. *Pri odstranjevanju smo bili previdni, da nismo polomili kosti.*
5. S škarjami smo nato ločili še stopalo od golenice in odstranili mišice. Golenico smo postavili v RPMI+ na ledu.
6. Stegnenico smo odstranili tako, da smo prerezali mišice ter jih postrgali stran. Izpahnili smo jo iz sklepa ter položili v medij.
7. Na enak način smo izrezali še obe nadlahtnici.
8. Odstranjene kosti, ki so se jih še držale mišice in vezivo, smo položili v petrijevko na ledu, ki je vsebovala mrzel medij za pridobitev KM, da se je tkivo zmehčalo.
9. Pripravili smo sveže rezilo (skalpel).
10. Vsako kost posebej smo prijeli s pinceto in jo na sterilni podlagi očistili mišičnega in vezivnega tkiva.
11. Kosti smo očistili z vlečenjem mišic stran in jih obrisali z gazo ter jih položili nazaj v RPMI+. Videz kosti po čiščenju prikazuje slika 5.1.1.1 (levo).
12. Ko smo vse kosti očistili, smo jih za 2 minuti namočili v 70 % etanol.
13. Kosti smo nato prenesli v PBS, s čimer smo sprali etanol. Za tem smo jih postavili v petrijevko z medijem za pridobitev KM.
14. SPIRANJE: Pripravili smo vse potrebno za postopek spiranja kosti: 50 ml-centrifugirko smo postavili na led in odprli pokrovček. Inzulinko smo napolnili z medijem za pridobitev KM.
15. Spodnjo stran petrijevke z mrzlim medijem za pridobitev KM in kostmi smo uporabili kot podlago in kosti odrezali na obeh koncih, da smo z obeh strani dobili odprtini s kostnim mozgom. *Kosti smo odrezali z ostrimi škarjami ali s skalpelom (slednje je bilo boljše).*
16. S pinceto smo držali eno od kosti in z iglo z vrha izprali KM iz kosti (slika 5.1.1.1, desno). Postopek smo večkrat ponovili na vseh kosteh, z obeh strani.
17. Izpiranje smo ponavljali, dokler kosti niso postale skoraj popolnoma bele. *Iglo smo morali običajno zavrtati v kost, da smo prišli do sredice. Pri tem smo kost držali z ravno pinceto.*
18. Ko smo izprali ves KM, smo inzulinko zamenjali z brizgalko z iglo velikosti 18G. Ker je KM v večjih skupkih, smo to brizgalko uporabili, da smo skozi večkrat potegnili celice, da je nastala enakomerna celična suspenzija.
19. Enakomerno celično suspenzijo smo nato prefiltrirali skozi 40 µm-najlonsko sito v 50 ml-centrifugirko. Pred filtriranjem smo namočili mrežo sita.
20. Po filtraciji smo dolili PBS+ s heparinom do skupnega volumna 40 ml ter pri tem sprali še sito (in položili na led).
21. Centrifugirali smo 5 minut pri 400xg, pri 4 °C. Supernatant smo odstranili in celice resuspendirali v primerni količini medija za nadaljnje delo (v našem primeru v 2 ml PBS+).
22. Medij s celicami smo dobro premešali in odstranili alikvot za štetje celic. Ostale celice smo postavili v ledeno kopel.



Slika 5.1.1.1: Videz kosti po čiščenju (levo). Spiranje kostnega mozga iz kosti (desno; foto: Mojca Jež).

5.1.2 METODA TRENJA KOSTI

Protokol je povzet po Ramkumar in sod. (2013), vključene so spremembe po avtorjih Lo Celso in Scadden (2007), McGarry (2014), Madaan (2014), Haylock in sod. (2007), Benton (2009) ter Duran-Struuck in Dysko (2009).

Material:

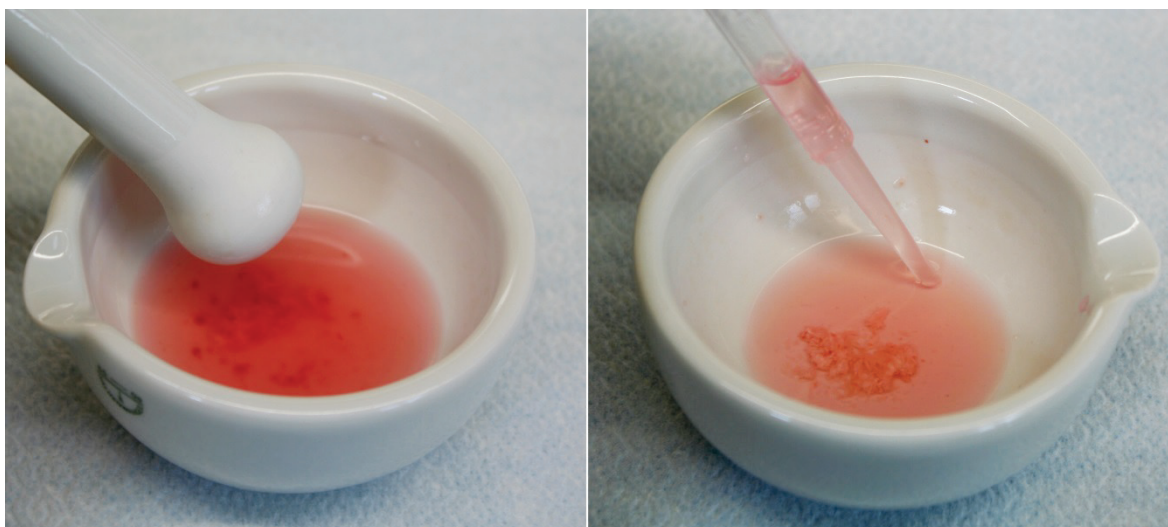
- | | |
|---|---|
| a) medij za pridobitev KM (RPMI+): | e) sterilna gaza |
| - RPMI-1640 z dodanim 25 mM HEPES | f) steriliziran terilnik in pestilo |
| (pH 7,0 – 7,5) in L-glutaminom (300 | g) PBS in PBS+ (PBS + 2% FBS + heparin |
| mg/l) (PAA) | (10 E/ml)) |
| - 1 mM EDTA (0,5 M EDTA Gibco | h) encimski pripravek kolagenaze |
| UltraPure, pH = 8) | (200 E/ml) in dispaze (0,6 E/ml) – po |
| - 2% FBS (fetalni goveji serum) | navodilih proizvajalca Gibco |
| - 1X PenStrep (penicilin (100 E/ml) + | i) petrijevke (60 mm) in centrifugirke |
| streptomycin (100 µg)) (PenStrep Gibco | (50 ml) |
| – 10.000 E/ml penicilina in | j) 40 µm-najlonska sita (Falcon) |
| 10.000 µg/ml streptomicina) | k) Pasteurjeve pipete |
| - heparin (10E/ml) (Braun – 5.000 E/ml) | l) pipete in konice za pipete s filtrom |
| b) 70% etanol | m) centrifuga s hlajenjem |
| c) razkužilo Asepsol (5% raztopina) | n) brezprašna komora |
| d) sterilna rezila (2 kosa), škarje (2 kosa) in | o) kadička z ledom |
| pincete (2 kosa ukrivljenih in ene ravna) | |

Delo je potekalo v brezprašni komori. Vse uporabljene raztopine in orodje je bilo sterilno. Medije, ki smo jih uporabljali med postopkom, smo postavili v kadičko z ledom. Tudi petrijevke, v katere smo dajali kosti, smo postavili na led.

Postopek:

1. Evtanazirane miši smo za 5 minut potopili v 5% raztopino Asepsol. Za tem smo jih položili na sterilno podlago. Ves čas ekstrakcije smo vse zelo dobro razkuževali z alkoholom.
2. Kožo smo zarezali na hrbtnem delu in jo s prsti povlekli narazen navzgor in navzdol. *Škarje in pinceto, ki smo ju uporabili za rezanje kože, smo nato zavrgli in pri nadaljnjem delu uporabili svež komplet.*
3. Z rezi smo odstranili glavne kosti: po dve golenici (*tibia*), stegenici (*femur*), nadlahtnici (*humerus*) in črevnici (*ilium*).
4. Golenico smo odstranili tako, da smo zarezali v vezivno tkivo nad kolenom in v mišice pod kolenom. Za tem smo zarezali skozi koleno, ločili golenico in jo nato še potegnili ven iz kože. *Pri odstranjevanju smo bili previdni, da nismo polomili kosti.*
5. S škarjami smo nato od golenice ločili še stopalo in odstranili mišice. Kost smo postavili v RPMI+ na ledu.
6. Steglenico smo odstranili tako, da smo prerezali mišice ter jih postrgali stran. Izpahnilo smo ga iz sklepa ter položili v medij.
7. Na enak način smo izrezali še obe nadlahtnici in obe črevnici.

8. Odstranjene kosti, ki so se jih še držale mišice in vezivo, smo za 5 minut položili v 60 mm petrijevko na ledu, ki vsebuje mrzel medij za pridobitev KM, da se je tkivo zmehčalo.
9. Za odstranitev hrbtenice smo odrezali rep in nato rezali ob hrbtenici spodaj, levo in desno, pri čemer smo pazili, da nismo zarezali v peritonej.
10. Pripravili smo sveže rezilo (skalpel).
11. Vsako odstranjeno kost posebej smo prijeli s pinceto in jo na sterilni podlagi očistili mišičnega in vezivnega tkiva. Tudi hrbtenico smo dobro očistili, jo na širih mestih prerezali in s pomočjo igle odstranili tudi hrbtenjačo.
12. Vse kosti smo obrisali z gazo in jih položili nazaj v RPMI+. Videz kosti po čiščenju prikazuje slika 5.1.1.1 (levo).
13. Očiščene kosti smo za 2 minuti namočili v 70 % etanolu.
14. Kosti smo nato prenesli v PBS, s čimer smo sprali etanol ter jih postavili v petrijevko z medijem za pridobitev KM.
15. TRENJE: Očiščene kosti smo prenesli v sterilni terilnik, ki vsebuje nekaj ml medija za pridobitev KM (običajno za kosti ene miške porabimo 6 ml medija).
16. S tolkačem smo strli kosti v fragmente. Najprej smo strli kosti (golenici, stegenici, nadlahtnici in črevnici) in nato hrbtenico. Trli smo, dokler se je slišalo »škrtanje«, bili smo pozorni, da kosti nismo strli v fin prah.
17. Po trenju smo s pipeto suspenzijo vbrizgavali in izbrizgavali, s tem premešali celice in jih odpipetirali skozi 40 µm-najlonsko sito v 50 ml-centrifugirko. Pred filtriranjem smo mrežo sita omočili z medijem.
18. Kostem, ki so ostale v terilniku smo ponovno dodali medij in ponovili trenje, celice premešali s pipeto in jih odpipetirali skozi 40 µm-najlonsko sito v centrifugirko. Kosti, ki ostanejo, so po trenju zelo svetle (slika 5.1.2.1, desno).
19. Enak postopek smo ponovili pri trenju hrbtenice.
20. Po filtraciji smo dolili PBS+ do skupnega volumna 40 ml in s tem tudi sprali celice s filtra.
21. Celično suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 400xg, pri 4 °C.
22. Supernatant smo odstranili in s centrifugirkami podrgnili po nosilcu, preden smo dolili primeren medij (s tem naj bi preprečili nastanek strdkov).
23. Celice smo nato resuspendirali v 2 ml PBS+ in postavili na ledeno kopel.
24. ENCIMSKA RAZGRADNJA: Kosti, ki so ostale po trenju, smo prenesli v centrifugirko in dodali 1 ml encimske raztopine na 3 kosti (približno 6 ml na kosti ene miši). Kosti so bile prekrite z raztopino.
25. Centrifugirko s kostmi in raztopino smo redno pretresali medtem, ko so bile kosti v inkubatorju 5 minut pri 37 °C.
26. Po inkubaciji smo dodali 15 ml PBS in energično stresali 15 sekund. Supernatant smo prefiltrirali skozi 40 µm-najlonsko sito v novo centrifugirko.
27. Postopek smo ponovili, v centrifugirko s kostmi dodali 15 ml PBS, energično stresali 15 sekund in prefiltrirali skozi 40 µm-najlonsko sito v isto centrifugirko kot prej. Kosti, ki so ostale, so bile popolnoma bele.
28. Celično suspenzijo smo centrifugirali 5 minut na 400 xg, pri 4 °C.
29. Supernatant smo odstranili in dolili 2 ml PBS+ s heparinom ter celice postavili v ledeno kopel.



Slika 5.1.2.1: Trenje kosti s pestilom v terlniku (levo). Po trenju ostanejo delci kosti, ki so zelo svetli (desno).

5.2 ŠTETJE CELIC

5.2.1 Štetje celic s hemocitometrom

Material:

- a) nigrozin
- b) PBS
- c) hemocitometer
- d) mikroskop
- e) pipete in konice pipet
- f) epice

Postopek:

1. Suspenziji celic (100 μ l) smo dodali nigrozin (300 μ l).
2. Ker so bile pri 1:4 redčenju celice pregoste, smo vzeli 25 μ l te mešanice in ji dodali 225 μ l nigrozina ali PBS.
3. S pipeto smo dobro premešali suspenzijo in po 10 μ l te mešanice dali v hemo,0citometer. Tudi pred vsakim redčenjem smo celično suspenzijo vedno dobro premešali.
4. Prešteli smo žive in mrtve celice v mreži pod mikroskopom (v štirih kvadratih, dvakrat ponovili štetje).
5. Izračunali smo koncentracijo in skupno število živih celic:

$$\text{Št. celic/ml v hemocitometru} = \text{povprečno št. živih celic v kvadratih} * 10^4 \quad \dots \quad (5.2.1.1)$$

$$\text{Št. celic/ml v epruveti} = \text{št. celic/ml v hemocitometru} * \text{količina redčenja} \quad \dots \quad (5.2.1.2)$$

$$\text{Skupno št. živih celic v epruveti} = \text{št. celic/ml v epruveti} * \text{št. ml izol. celične susp.} \quad \dots \quad (5.2.1.3)$$

$$\text{Viabilnost (\%)} = \text{št. živih celic / št. vseh celic} * 100 \quad \dots \quad (5.2.1.4)$$

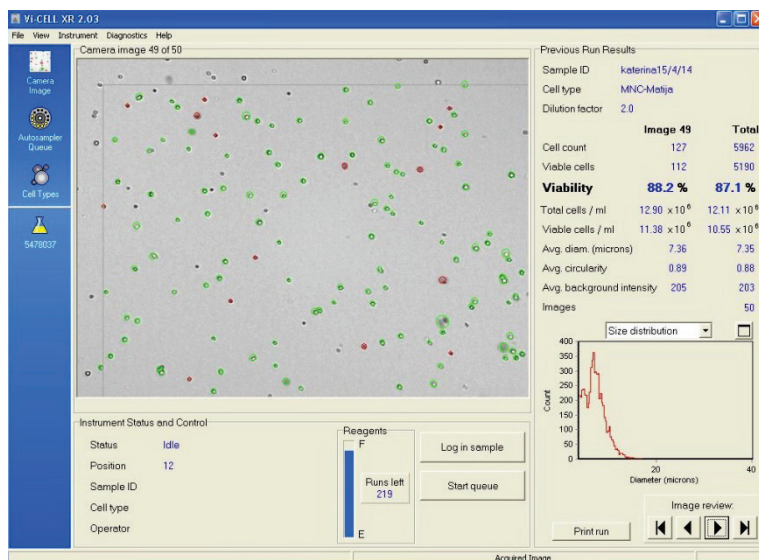
5.2.2 Avtomatizirano štetje celic z Vi-CELL XR

Material:

- avtomatska naprava Vi-CELL XR, podjetja Beckman Coulter
- PBS
- merilne kivete za Vi-CELL
- pipete in konice za pipete

Postopek:

- V merilno kiveto smo razredčili 100 μ l celične suspenzije s 400 μ l PBS (lahko smo redčili tudi bolj, kar je bilo odvisno od gostote celičnega pripravka). Postavili smo jo v nosilec in nadaljevali po navodilih proizvajalca Vi-CELL.
- Pridobljene rezultate smo zapisali in shranili na disk računalnika.



Slika 5.2.2.1: Zajeta slika zaslona pri štetju celic in določanju viabilnosti z napravo Vi-CELL XR.

5.3 OPAZOVANJE CELIC Z MIKROSKOPIJO

Vsako pridobljeno celično suspenzijo smo si ogledali tudi pod mikroskopom, da bi videli splošno strukturo presadka, ali so v pripravku prisotni skupki celic, koščki kosti ali drugih tkiv ipd.

Pripravili smo preparate in si jih ogledali pod invertnim mikroskopom Nikon ECLIPSE Ti-S ter pri tem uporabili računalniški program NiS-Elements D. Posnetke smo shranili na disk računalnika.

5.4 ZAMRZOVANJE CELIC

Zanimalo nas je, ali bi lahko izolirane celice KM shranili v tekočem dušiku in jih za namene presaditve uporabili kasneje. Celice smo zamrznili in jih čez nekaj dni odmrznili ter preverili njihovo preživetje.

5.4.1 Zamrzovanje

Material:

- a) medij za zamrzovanje: 10 % DMSO, 45 % FBS in 45 % RPMI-1640
- b) ampula za zamrzovanje
- c) centrifugirke
- d) posodica z vodo (37 °C)
- e) pipete in konice za pipete s filtri

Postopek:

1. Celice smo najprej centrifugirali in odstranili supernatant ter dodali 1 ml medija za zamrzovanje, s katerim smo jih tudi resuspendirali. Suspenzijo celic smo prenesli v ampulo za zamrzovanje.
2. Celice smo najprej za 24 ur zamrznili pri -70 °C, nato smo jih prenesli v posodo s tekočim dušikom.

5.4.2 Odmrzovanje

Material:

- a) RPMI+ (RPMI-1640 z dodanim 25 mM HEPES (pH 7,0 – 7,5) in L-glutaminom (300 mg/l), 1 mM EDTA, 2 % FBS (fetalni goveji serum), 1X PenStrep (penicilin (100 E/ml) + streptomycin (100 µg)) in heparin (10 E/ml))
- b) PBS+ (PBS + 2 % FBS + heparin (10 E/ml))
- c) 40 µm-najlonsko sito (Falcon)
- d) centrifugirke (15 ml)
- e) posodica z vodo (37 °C)
- f) Pasteurjeve pipete
- g) hemocitometer

Postopek:

1. Pred odmrzovanjem smo pripravili brezprašno komoro in ves material. Približno 30 ml RPMI+ smo segreli na 37 °C. V brezprašni komori smo postavili toliko 15 ml-centrifugirk, kolikor je bilo ampul z zmrznjenimi celicami. V te centrifugirke smo odpipetirali po 7 ml prej segretega RPMI+.
2. Ko smo celice vzeli iz tekočega dušika, smo ampule položili v vodo s temperaturo 37 °C. Pri tem smo pazili, da nismo pomočili pokrovčkov, kar bi kasneje lahko kontaminiralo celice. Celično suspenzijo smo raztopili toliko, da je še ostal majhen košček ledu.
3. Celično suspenzijo smo prenesli v 15 ml-centrifugirko in resuspendirali z RPMI+, centrifugirali 5 min pri 400 xg ter odstranili supernatant⁷. Usedlino smo resuspendirali v PBS+ ter prefiltrirali skozi 40 µm-najlonsko sito v novo centrifugirko.
4. Odvzeli smo 100 µl in celice prešteli s hemocitometrom ter določili njihovo viabilnost.

⁷ Poskrbeli smo, da je postopek odmrznitve in spiranja celic potekal hitro, saj je zelo pomembno hitro odstraniti DMSO, ker je celicam škodljiv.

5.5 SHRANJEVANJE CELIC NA 4 °C IN NA SOBNI TEMPERATURI

Zanimalo nas je, koliko časa bodo celice ostale žive po izolaciji iz darovalčevega KM. Celice smo shranili v hladilnik, na 4 °C, in na sobno temperaturo (v temi) ter jih v več intervalih prešteli in določili viabilnost. Štetje smo opravili ročno, s hemocitometrom, viabilnost pa smo določali s pretočno citometrijo z uporabo barvila 7-AAD.

Uporabljen medij za shranjevanje:

- a) RPMI-1640 z dodanim 25 mM HEPES (pH 7,0 – 7,5) in L-glutaminom (300 mg/l) (PAA)
- b) 2% FBS (fetalni goveji serum)
- c) 1X PenStrep (penicilin (100 E/ml) + streptomycin (100 µg); PenStrep Gibco)
- d) heparin (10E/ml; Braun)

5.6 LIZA ERITROCITOV

V želji, da bi pripravili celični presadek z manjšo gostoto celic, smo se odločili lizirati eritrocite. Sprva smo opravili preizkus lize eritrocitov.

V navodilih proizvajalca uporabljenega pufra za lizo je navedeno, da je za lizo mišjih eritrocitov potreben čas inkubacije 3 minute. Da bi natančno določili primeren čas za naš poskus, smo več vzorčkov primerjali med seboj in lizirali po 3 minute, 5 minut, 7,5 minut ter 10 minut.

Material:

- a) pufer za lizo eritrocitov (PD Pharm Lyse 10X)
- b) PBS ali PBS+ (PBS + 2% FBS + heparin (10 E/ml; Braun))
- c) centrifugirke
- d) pipere in konice za pipete
- e) centrifuga

Postopek:

1. 10x pufer za lizo smo sprva 10-krat razredčili.
2. Celično suspenzijo smo centrifugirali 5 minut na 400 xg in odstranili supernatant.
3. Usedlini smo dodali 2 ml že razredčenega pufra za lizo celic in v temi pustili za 3 (5, 7,5 ali 10) minut.
4. Za tem smo suspenziji dolili PBS, centrifugirali 5 minut pri 400 xg ter odstranili supernatant.
5. Usedlino smo ponovno resuspendirali v PBS.

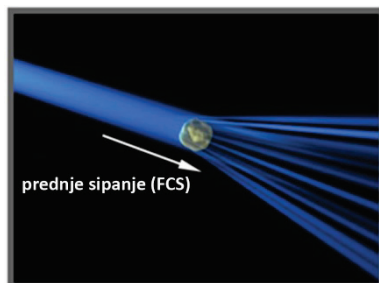
Vzorke smo analizirali s pretočnim citometrom in celice prešteli z Vi-CELL XR.

5.7 PRETOČNA CITOMETRIJA

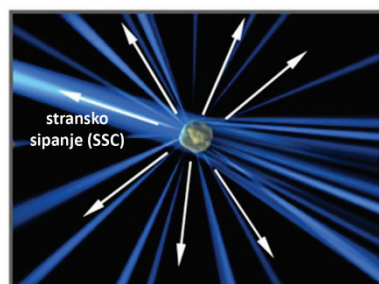
Pretočna citometrija je tehnika klasifikacije, štetja in razvrščanja mikroskopsko majhnih delcev, kot so celice, kromosomi in jedra. Vzorec se običajno označi s fluorokromi, ki se pritrdijo na molekule in kažejo na fiziološke funkcije ali kemične lastnosti delcev. Ta vzorec se nato postavi v pretočni citometer, napravo, ki s hitrostjo nekaj tisoč celic na sekundo zazna nekatere lastnosti posameznih celic.

Pretočni citometer gradijo trije sistemi: pretočna komora, optični sistem in elektronski sistem (Fuchs, 2014). Pretočna komora (imenovana tudi pretočna celica) je najpomembnejši del naprave, saj se v njem vzorec razporedi v tanek tok, v katerem so celice razporejene ena za drugo. Optični sistem, ki ga sestavljajo laserji različnih valovnih dolžin (najpogosteje med 400 in 700 nm), zrcal in leč, usmerja tanek snop svetlobe na tok celic v pretočni komori, elektronski sistem pa zazna od celic razpršeno oz. oddano svetlobo ter jo pretvori v sorazmerni električni signal. Te signale računalniški program digitalizira ter pripravi za analizo.

Pri analizi lahko o celicah dobimo dva tipa podatkov. Prvi tip predstavljajo sipanje svetlobe pod različnimi koti, drugega pa fluorescence različnih valovnih dolžin. Svetlobo, razpršeno pod majhnimi koti ($2-15^\circ$), imenujemo prednje sipanje (angl. *forward-scatter*, FSC) in svetlobo odbito pod večjimi koti ($15-90^\circ$), imenujemo stransko sipanje (angl. *side-scatter*, SSC). Prednje sipanje se uporablja kot relativna mera za velikost celic, stransko sipanje pa je merilo za granularnost celic (Lipoglavšek in Avguštin, 2000).



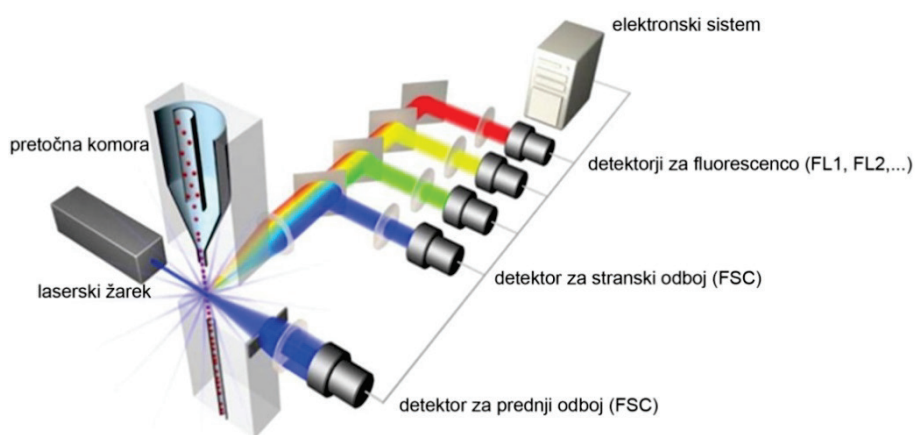
Slika 5.7.1: Prednje sipanje (FSC) je signal, ki je sorazmeren velikosti celic. Ko laserski žarek zadane celico, se nekaj svetlobe odbije od njenega površja, a pod majhnimi koti. Svetlobo prednjega sipanja zbira fotodetektor, ki je postavljen v ravni z laserjem (Fuchs, 2014).



Slika 5.7.2: Stransko sipanje (SSC) je parameter, ki meri znotrajcelično kompleksnost, s tem ko zbira svetlobo razpršeno pod večjimi koti. Ko laserski žarek zadane celico, njena notranja zgradba povzroči, da se svetloba odbija in razprši v vse smeri. Več ima notranjih organelov, bolj se svetloba odbija v vseh smereh. Eritrociti, na primer, so brez jedra in imajo zelo malo organelov, zato ustvarjajo nizek SSC signal, medtem ko imajo limfociti jedro in veliko več organelov, zato ustvarjajo višji SSC signal (Fuchs, 2014).

Pri pretočni citometriji lahko uporabimo fluorokrome, ki se vežejo na celice. Svetloba laserskega žarka fluorokrome vzbudi in ti oddajo svetlobo drugačne valovne dolžine od laserske svetlobe. Svetloba se razprši v isti smeri kot stransko sipanje, le da prehaja še čez vrsto svetlobnih filtrov, ki dovoljujejo prehod le določenih valovnih dolžin. Svetloba doseže detektorje, ki ustvarjajo električne signale na podlagi jakosti pri izbrani valovni dolžini. Električne signale digitalizira računalniški program ter jih pripravi za analizo – rezultat so tako imenovani fluorescenčni signali (FL1, FL2, FL3 itd.) (Fuchs, 2014).

Pretočna citometrija dovoljuje tudi hkratne meritve več parametrov in lahko ločuje med seboj fluorokrome, ki imajo svoje emisijske spektre relativno blizu drug drugim. En vzorec lahko tretiramo z več različnimi fluorokromi ter jih hkrati analiziramo.



Slika 5.7.3: Shema pretočnega citometra s pretočno komoro, optičnim sistemom in elektronskim sistemom (Fuchs, 2014).

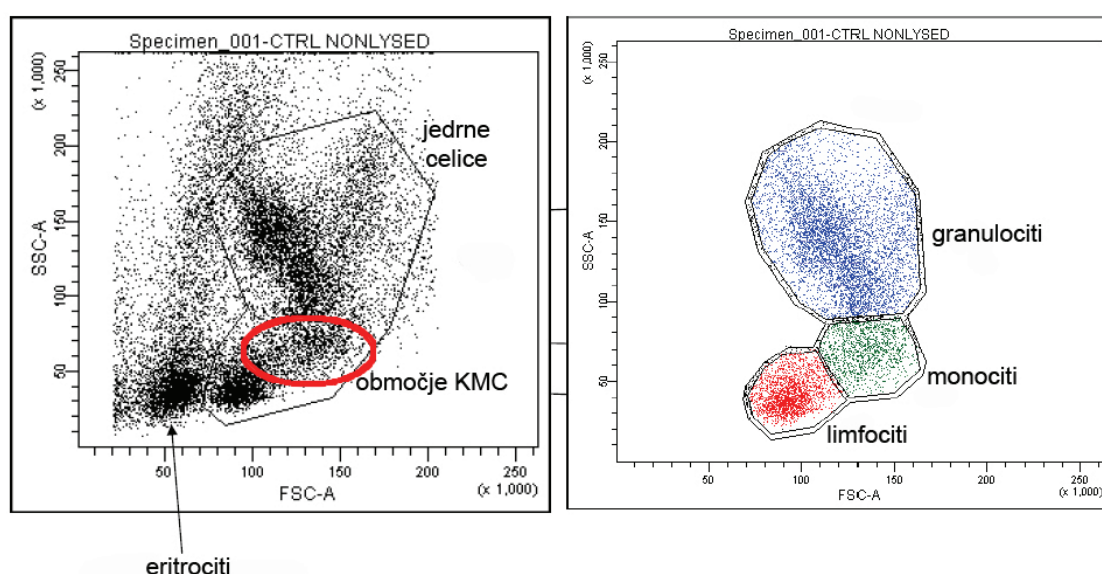
Dodatna možnost pretočne citometrije je fizično ločevanje fluorescenčno označenih celic (FACS, angl. *fluorescence-activated cell sorting*). Raztopino, ki preide pretočno komoro, aparat razbije na drobne kapljice (tako da šoba vibrira pri zelo visoki frekvenci, okoli 100.000 Hz). Vsaka kapljica vsebuje eno celico in na osnovi podatkov, ki jih je analiziral pretočni citometer, se na želeni kapljici ustvari naboj. Na podlagi tega naboja lahko pretočni citometer izbrane kapljice (ki vsebujejo posamezne celice) loči od ostalih. Ko kapljica potuje med dvema ploščama z visoko napetostjo, jo ena od plošč privlači in jo na ta način pod kotom loči v eno od kivet. Kapljice brez naboja padejo naravnost navzdol v odpadno kiveto. Pri ločevanju je pomembno vedeti, da je električni naboj le na kapljici, in ne na celici, in da je tudi ta odstranjen, ko je ločen od ostalega toka (Fuchs, 2014).

5.7.1 Uporaba pretočne citometrije

Metodo pretočne citometrije smo uporabili za določanje viabilnosti celic izoliranih iz kostnega mozga, za določanje odstotnih deležev eritrocitov in jedrnih celic ter za ugotavljanje uspešnosti barvanja celic KM s fluorescenčnim barvilom PKH26. Uporabili smo napravo BD FACSCaliburTM ter za analizo uporabili računalniški program CellQuest Pro.

Sprva je bilo potrebno nastaviti občutljivost detektorjev v pravo območje in se nato s postavitvijo praga (angl. *threshold*) znebiti šuma. Če delec pri izbranem parametru preseže vrednost praga, se aktivirajo še drugi detektorji in zabeležijo merjene vrednosti. Če pa delec ne preseže vrednosti, ki je postavljena kot prag, se njegove prisotnosti ne zazna (Lipoglavšek in Avguštin, 2000).

Vedeli smo, da lahko za celice KM pričakujemo grafikon SSC/FSC z videzom, kot ga prikazuje slika 5.7.1.1 (Michalová in sod., 2014). Analizo smo omejili le na populacijo jedrnih celic, znotraj katerih so tudi krvotvorne matične celice. Izbranim populacijam smo s pomočjo točkovnega grafikona (angl. *dot plot*) določali viabilnost celic ali obarvanost celic s PKH26.



Slika 5.7.1.1: Analiza celic KM s pretočnim citometrom (Michalová in sod., 2014).. Na levi je označeno območje jedrnih celic in krvotvornih matičnih celic (KMC), na desni so posebej označene populacije limfocitov, monocitov in granulocitov.

5.7.1.1 Določanje deleža jedrnih celic in njihove viabilnosti

Pred analizo celic KM s pretočnim citometrom smo celicam dodali fluorescenčno barvilo 7-AAD (7-Aminoactinomycin D), ki ima močno afiniteto za DNA. Ker ne prehaja preko membrane živih celic, se ga pogosto uporablja za določanje viabilnosti, saj obarva le DNA mrtvih celic.

Material:

- PBS
- barvilo 7-AAD (BD)
- vibracijsko mešalo (vorteks)
- epruvete za pretočni citometer
- pipete in konice za pipete

Postopek:

1. Suspenziji celic (50 μ l) smo dodali 5 μ l barvila 7-AAD, jo vorteksirali in inkubirali 15 minut v temi. V tem času so se mrtve celice obarvale z barvilom 7-AAD, medtem ko so žive ostale neobarvane.
2. Za tem smo dodali 500 μ l PBS in vzorec analizirali s pretočnim citometrom.
3. Na grafu FSC/SSC smo izbrali populacijo jedrnih celic (R1) in s tem izključili celični debris in eritrocite. Izbrani populaciji smo na točkovnem grafikonu določili viabilnost.

5.7.1.2 Določanje odstotka obarvanih celic KM z barvilom PKH26

Pri testiranju protokola barvanja s fluorescenčnim barvilom PKH26 smo uporabili presežno število celic po izolaciji celic KM (postopek barvanja je opisan v poglavju 5.8).

Material:

- a) PBS
- b) vibracijsko mešalo (vorteks)
- c) epruvete za pretočni citometer

Postopek:

1. Sprva smo analizirali neobarvane celice. Suspenziji celic (50 μ l) smo dodali 500 μ l PBS, jo vorteksirali in analizirali s pretočnim citometrom. Celicam v izbranem območju R1 smo na točkovnem grafikonu nastavili mejo, ki bo ločevala PKH26-pozitivne in PKH26-negativne celice glede na intenziteto avtofluorescence celic pri neobarvanem vzorcu.
2. Za tem smo analizirali še vzorec z obarvanimi celicami: suspenziji (50 μ l) smo dodali 500 μ l PBS, jo vorteksirali in postavili v pretočni citometer. Na točkovnem grafikonu smo odčitali odstotek obarvanih celic.

5.8 BARVANJE Z BARVILOM PKH26

Zaradi možnosti, da do himerizma v KM po presaditvi ne pride zaradi zavračanja presajenih celic, ki nosijo Y-kromosom, smo opravili poskus presaditve, pri katerem smo spremljali ugnezdenje celic darovalcev obeh spolov v žensko žival. Zanimalo nas je, ali bo opazna kakšna vidna razlika v številu ugnezdenih celic v KM 24 ur po presaditvi. Obarvane celice (16,4 milijonov celic KM samičke in 12,3 milijonov celic KM samčka) smo presadili dvema prejemnicama (označeni z M 3 in 4).

Za barvanje celic presadka smo uporabili fluorescenčno barvilo PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (MINI26), proizvajalca Sigma-Aldrich, za katerega smo se odločili na podlagi uspešnosti barvanja Ude in sod. (2012), ki so s PKH26 obarvane matične celice KM spremljali do 49 dni. To rumeno-oranžno fluorescenčno barvilo se s svojimi dolgimi alifatskimi repi stabilno vključi v lipidne dele celične membrane in se pri delitvi enakomerno razdeli v hčerinske celice (Lanzkron in sod., 1999). Če je bilo barvanje izvedeno na pravi način, niso opazili nobenih toksičnih stranskih učinkov barvanja, ni bilo učinkov na sprijemanje ali na proliferacijo, prav tako se barvilo ni prenašalo na sosednje celice (Ude in sod., 2012), medtem ko Li in sod. (2013) pravijo, da celični debris lahko

obarva tudi nebarvana tkiva in se jim v primeru dolgotrajnih barvanj PKH26 ne zdi najboljši.

PKH26 zlahka zazna tako fluorescenčni mikroskop kot pretočni citometer. Optimalna ekscitacijska valovna dolžina je 551 nm in emisijska valovna dolžina 567 nm.

Pri barvanju uporabljamo topilo C, ki je vodna raztopina, namenjena ohranjanju celične viabilnosti ter hkratnemu povečanju topnosti barvila in učinkovitosti barvanja.

Material:

- a) barvilo PKH26 in topilo C (MINI26, Sigma-Aldrich)
- b) RPMI-1640 z 1 % FBS
- c) PBS
- d) centrifugirke (50 ml)
- e) pipete in konice za pipete

Postopek:

Postopek je povzet po navodilih Sigma-Aldrich®.

1. Celično suspenzijo z 100×10^6 celic KM smo enkrat sprali s PBS.
2. Suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 400 xg in previdno odstranili supernatant.
3. Dodali smo 5 ml topila C (in s tem pripravili 2X celično suspenzijo) ter resuspendirali z nežnim pipetiranjem (nismo vorteksirali in celice nismo dolgo pustili v topilu C).
4. Tik pred pričetkom barvanja smo v centrifugirki pripravili 2X barvno raztopino (4×10^{-6} M) v topilu C, tako da smo dodali 20 μ l etanolne raztopine PKH26 v 5 ml topila C. Dobro smo premešali.
5. 5 ml 2X celične suspenzije iz koraka 3 smo hitro dodali 5 ml 2X barvne raztopine iz koraka 4 ter vzorec takoj premešali s pipetiranjem. Končna koncentracija po mešanju je bila 1×10^7 celic/ml in 2×10^{-6} M PKH26 v volumnu 10 ml.
6. Mešanico smo inkubirali 5 minut v temi ter vmes redno mešali.
7. Barvanje smo zaustavili tako, da smo dodali 20 ml medija RPMI-1640 z 1 % FBS.
8. Celice smo centrifugirali 10 minut pri 400 xg pri sobni temperaturi in nato previdno odstranili supernatant. Usedlino smo resuspendirali v 10 ml medija, prenesli v svežo centrifugirko, ponovno centrifugirali 5 minut pri 400 xg ter na ta način z 10 ml še dvakrat oprali celice, s čimer smo odstranili nevezano barvilo.
9. Alikvot celic smo nato resuspendirali v 500 μ L pufra PBS ter jih analizirali s pretočnim citometrom.
10. Celice, ki so bile namenjene presaditvi, smo pred zadnjim centrifugiranjem prefiltrirali skozi 50 μ m-sito ter celice pripravili za presaditev po postopku, opisanem v poglavju 5.10.

5.9 PREIZKUS MEDIJEV ZA IZOLACIJO CELIC KM

Zaradi zapletov pri sami injekciji presadka prejemnicam, smo se odločili preizkusiti nekaj različnih medijev za izolacijo celic KM. Medij za izolacijo celic, ki smo ga uporabili pri presaditvah, je bil pregost in lepljiv, včasih se je tudi penil. Nekajkrat so zaradi presadka prejemnice takoj po injekciji poginile.

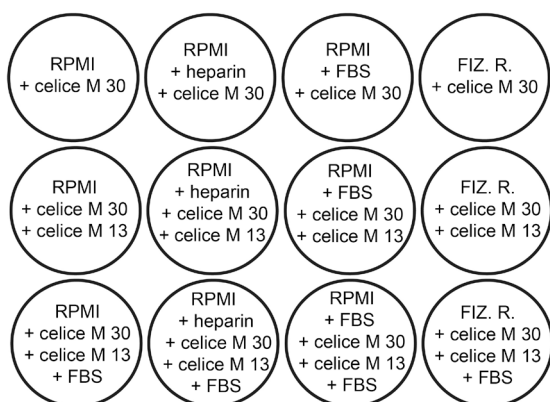
Ker smo želeli ugotoviti, ali so za smrt prejemnic krivi morebitni krvni strdki ali pa je vzrok v kateri od sestavin medija, smo celice iz kosti testno izolirali s štirimi različnimi mediji: RPMI-1640, RPMI-1640 s heparinom (10E/ml), RPMI-1640 s FBS (2 %) in s fiziološko raztopino. Postopek trenja je potekal po ustaljenem protokolu (5.1.2), le da smo vsakokrat uporabili drug medij. Trli smo kosti hrbtenice, ki smo jo razdelili na štiri dele.

Sprva smo celične suspenzije analizirali s pretočnim citometrom. Za tem smo jih centrifugirali 5 minut na 490 xg ter določili število celic in viabilnost v supernatantu ter v usedlini.

Celice, izolirane v različnih medijih smo po izolaciji dali gojiti. Na plošči za gojenje celičnih kultur z dvanajstimi odprtiniami smo jih porazdelili na naslednji način: v prvo vrsto smo dali celične suspenzije, izolirane v različnih medijih, v drugo vrsto smo dodali celične suspenzije, izolirane v različnih medijih z dodanimi celicami KM druge miši, in v tretjo vrsto smo dodali celične suspenzije, izolirane v različnih medijih z dodanimi celicami KM druge miši ter FBS (10 %). Vsakih celic je bilo po dva milijona.

V vsako vdolbinico smo dodali 2 ml DMEM medija s fenol rdečim in ploščo za 24 ur postavili v inkubator na 37 °C in 5 % CO₂.

Naslednji dan smo celične suspenzije na plošči za gojenje celičnih kultur opazovali pod mikroskopom in jih analizirali s pretočno citometrijo.

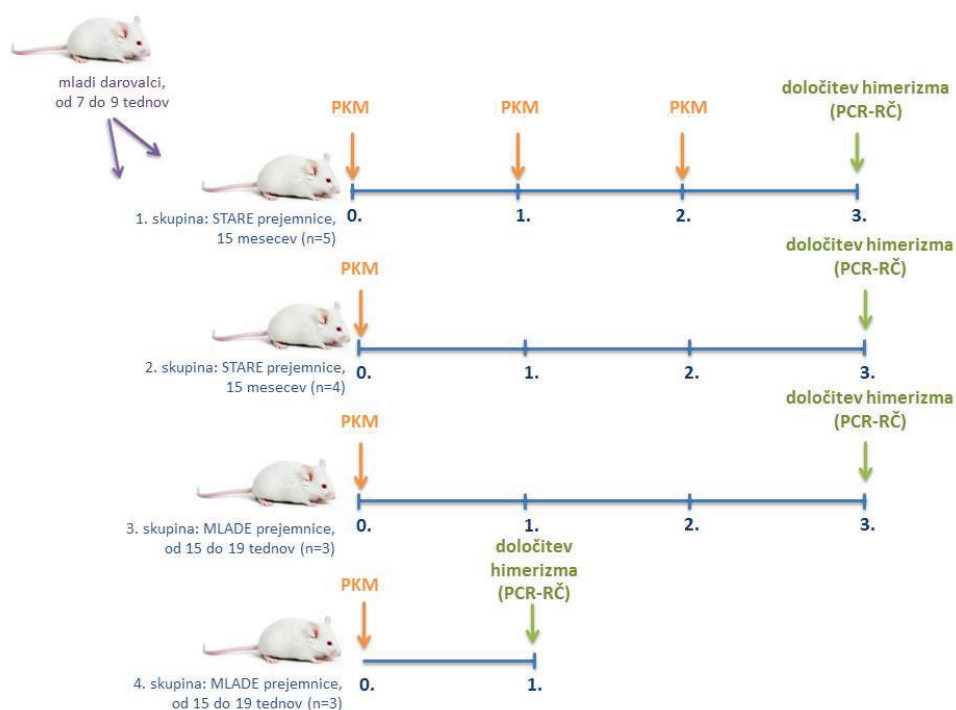


Slika 5.9.1: Kombiniranje celic, izoliranih v različnih medijih, dveh osebkov (M 30 in M 13).

5.10 PRESADITEV KOSTNEGA MOZGA

Osnovni namen pri našem poskusu je bil presaditi 120×10^6 celic KM, kar po Colvin in sod. (2004) predstavlja 21 % celotnega števila celic KM pri miših BALB/c. Po presaditvi naj bi ta količina vodila v okoli 20 % himerizem. Na podlagi izkušenj predhodnih raziskovalcev (Brecher in sod., 1982, Kovina in sod., 2013), ki kažejo, da v posamezni dozi ne sme biti prevelike gostote celic ali prevelikega volumna tekočine, saj eno ali drugo vodi v smrt prejemnic, smo se odločili presaditi do 40×10^6 celic KM na presadek.

Slika 5.10.1 prikazuje idejno zasnovo poskusa. Stare prejemnice bi prejele eno serijo ($n=4$) ali tri serije ($n=5$) presaditev, eno vsak mesec. Uspešnost vsaditve bi preverjali po treh mesecih po prvi presaditvi. Mlade prejemnice bi prejele le eno serijo presaditev, uspešnost vsaditve pa bi preverjali po enem ($n=3$) in treh mesecih ($n=3$).



Slika 5.10.1: Idejna zasnova poskusa presaditve kostnega mozga (PKM).

5.10.1 Presaditev celic KM v prejemnice BALB/c

Izolirane celice KM mladih samcev, starosti 7 do 9 tednov, smo presadili samicam prejemnicam, starosti 15 do 19 tednov in 15 mesecev. Prejemnice so prejele sveže izolirane celice in celice, ki so bile en dan shranjene na 4°C , del starih prejemnic je vedno prejel le sveže izolirane celice KM (1. skupina).

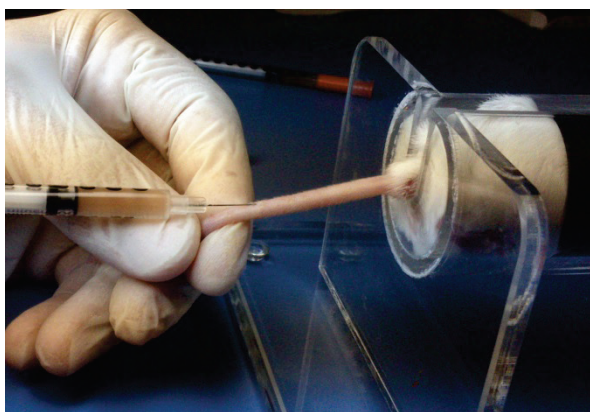
Protokol je z manjšimi variacijami povzet po Ramkumar in sod. (2013).

Material:

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| a) pripravek celic KM | f) centrifugirka |
| b) PBS s heparinom (10 E/ml, Braun) | g) 40 µm-najlonsko sito |
| c) imobilizator za miši | h) centrifuga z nadzirano temperaturo |
| d) ogreta voda (na približno 50°C) | i) mikroskop |
| e) inzulinke | j) brezprašna komora (laminarij) |

Postopek:

1. Zadnjemu spiranju celic s PBS in heparinom je sledilo filtriranje preko 40 µm-najlonskega sita in 5 minutno centrifugiranje na 400 xg, pri 4°C.
2. Supernatant smo odstranili in usedlino razredčili z 1 do 2 ml PBS s heparinom ter odvzeli 25 µl za štetje celic.
3. Ko smo določili število celic, smo celično suspenzijo porazdelili po epicah, jih ponovno 5 minut centrifugirali na 400 xg ter jih razredčili s PBS s heparinom tako, da smo v posamezno brizgo lahko dali od 20 do 40 milijonov celic v 110 do 200 µl (ali celo 300 µl).
4. Preden smo celične suspenzije porazdelili v brizge, smo jih vorteksirali (vsaj 30 sek na 1800 obratov/min) in mešali s pipeto ter pod mikroskopom preverili, da celice niso bile zlepljene in ali so bili prisotni morebitni ostanki kosti. Pomembno je bilo tudi, da se suspenzija ni penila. Ta predpriprava je bila zelo pomembna za preživetje prejemnic.
5. Celice smo porazdelili v inzulinke z zadnje strani, saj se z vlečenjem skozi iglo celice lahko poškodujejo zaradi velikih strižnih sil. Čas od priprave inzulinke do presaditve je moral biti čim krajši, zato smo vzporedno s pripravo presadkov pripravili prejemnice.
6. Pred injekcijo presadka v rep prejemnic smo ga ogreli tako, da smo ga položili v ogreto vodo za nekaj minut. To povzroči razširitev žil, ki postanejo bolj vidne. V vmesnem času smo z rokami greti tudi brizge, da se je malce ogrel medij s celicami.
7. Rep smo sterilizirali z gazo, namočeno v alkoholu in celice injicirali v eno izmed repnih žil (v eno od dveh ven, lateralno in medialno, slika 5.10.1.1).



Slika 5.10.1.1: Injiciranje presadka v repno veno.

5.10.2 Korekcija priprave presadka

V želji, da celične suspenzije namenjene presaditvi ne bi vsebovale zlepljenih celic, smo iskali 40 µm-sita, ki bi jih lahko uporabili za filtriranje presadka, tik pred prenosom v

injekcijsko brizgo. Primerna sita za filtriranje celične suspenzije z veliko gostoto in majhnim volumnom smo našli šele po vseh opravljenih presaditvah, tako da smo jih v okviru te diplomske naloge testirali le za namene prihodnjih presaditev.

Izbrana sita so Pre-Separation Filters (30 μm), podjetja Miltenyi Biotec, ki so primerna za filtriranje celičnih suspenzij z volumnom 500 μl do 3.500 μl . Njihovo učinkovitost smo preizkusili na pripravku izoliranih celic KM z liziranimi eritrociti (po postopku s 3 minutno lizo, poglavje 5.6) ter jih dvakrat sprali s PBS.

Material:

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| a) pripravek celic KM | g) pipete in konice za pipete |
| b) PBS | h) centrifuga z nadzirano temperaturo |
| c) Miltenyi sita (30 μm) | i) brezprašna komora (laminarij) |
| d) epice | j) mikroskop |
| e) stojalo za epice | k) avtomatska naprava Vi-CELL |
| f) Pasteurjeve pipete | l) pretočni citometer |

Potek:

1. Po končani izolaciji celic KM (ki je vključevala lizo eritrocitov) smo celično suspenzijo centrifugirali 5 minut na 490 xg in odstranili supernatant.
2. Usedlino smo resuspendirali v 500 μl PBS in celice prešteli.
3. Pripravili smo epico v stojalu in v odprto vstavili Miltenyi sito.
4. V sito smo najprej odpipetirali 100 μl PBS, da smo ga omočili, in šele nato smo odpipetirali 500 μl celične suspenzije. Za tem smo sito sprali še s 100 μl PBS.
5. Ker je bila kapljica celic po tem še vedno ujeta v situ, smo s Pasteurjevo pipeto vpihnili zrak v sito in tekočina je stekla v epico.
6. Prefiltrirano celično suspenzijo smo pregledali pod elektronskim mikroskopom, celice prešteli z avtomatsko napravo Vi-CELL in jih analizirali s pretočnim citometrom.
7. Če bi nadaljevali s postopkom, bi celično suspenzijo porazdelili po brizgah (inzulinkah) in čim prej opravili presaditev.

5.11 DOLOČITEV USPEŠNOSTI PRESADITVE

5.11.1 Odvzem vzorcev KM, nekaterih organov in krvi

Odvzem vzorcev KM

Vzorci za določanje himerizma v KM smo pridobili po enaki metodi trenja, kot za presaditev (poglavje 3.1.2), le da smo celice KM vzeli le iz šestih glavnih kosti: po dve golenici (*tibia*), stegnenici (*femur*) in nadlahtnici (*humerus*).

Iz pridobljene celične suspenzije smo odvzeli do 10 milijonov celic in iz njih izolirali DNA s pomočjo Bio robota EZ1 (po postopku v poglavju 5.11.2). Preostanek celic smo dali v epice, centrifugirali 5 min na 400 xg, odstranili supernatant, usedlino pa hitro zamrznili v tekočem dušiku ter epice shranili v zamrzovalnik na -80 °C (namenjeno morebitni ponovitvi poskusa).

Odvzem vzorcev nekaterih organov

Med raziskavo smo pri vseh prejemnicah preverjali himerizem tudi v vranici in pri starih prejemnicah tudi v nekaterih drugih organih: pljučih, jetrih, ledvicah in delu repa (kožo in podkožje nad mestom injekcije celic).

Material: (poglavje 5.1.2)

Postopek:

1. Vzorce za določanje himerizma v organih smo pridobili po enaki postopkih kot pri metodi trenja (poglavje 5.1.2), le da smo po odstranitvi kosti odvzeli še vranico, pljuča, jetra, ledvice in del repa ter jih položili v medij za izolacijo celic.
Vranica: pri M A smo vranico prerezali prečno in za vzorec vzeli robni in sredinski del. Pri ostalih smo izrezali cel organ.
Pljuča: izrezali smo celotno levo ali desno pljučno krilo.
Ledvice: izrezali smo celo levo ali desno ledvico.
Jetra: izrezali smo del jeter (sorazmerno velikosti ledvic)
Rep: nad mestom vboda smo z vzdolžnim rezom odstranili del repa (kožo in podkožje – do kosti), po dolžini približno 1 cm.
2. Po trenju kosti (po 27. točki protokola trenja kosti) smo očistili terilnik in ga dobro razkužili z alkoholom. Postopek čiščenja in razkuževanja smo ponovili pred vsakim novim vzorcem.
3. Vsak posamezni organ smo s pomočjo pincete pomočili v tekoči dušik za nekaj sekund, da je otrdel, ter ga nato strli v terilniku.
4. Dodali smo nekaj kapljic medija in skušali narediti čim bolj homogeno celično suspenzijo (največ do 1 ml).
5. S Pasteurjevo pipeto smo celično suspenzijo prenesli v označeno epico in jo shranili na ledu (oz. hladilniku do izolacije DNA).

Izolacijo DNA iz organov smo opravili tako, da smo iz pridobljene suspenzije celic odvzeli 25 µl ter opravili izolacijo s pomočjo kompleta podjetja Qiagen, DNeasy® Blood & Tissue Kit (poglavje 3.9.2).

Odvzem vzorcev krvi

Med raziskavo smo prejemnicam dvakrat vzeli vzorec periferne krvi:

1. Želeli smo preveriti, ali v periferni krvi morda lahko z metodo PCR v realnem času zaznamo moške celice darovalcev pri prejemnicah. Kri prejemnic smo združili v bazene, in sicer BAZEN X (kri prejemnic z oznako M 10, 11, 13, 30 in 40), BAZEN Y (kri prejemnic z oznako M 14, 31, 33 in 0) in BAZEN Z (kri prejemnic z oznako 1, 3 in 4).
2. Želeli smo preveriti, ali je sama injekcija celic v repno veno uspešna. V ta namen smo zbrali vzorce periferne krvi 15 do 30 minut po injekciji presadka (n=3). DNA smo izolirali ločeno za vsak vzorec.

Material:

- a) Microvette epruvete (EDTA)
- b) etanol
- c) sterilne gaze
- d) škarje
- e) imobilizator za miši

Postopek:

1. Miši smo položili v imobilizator, z etanolom napojili gaze ter razkužili rep.
2. S škarjami smo odščipnili vrh repa (1 mm) in kapljice krvi zajemali z epruvetkami Microvette, ki so obložene z EDTA (kri izteka iz vrha repa ob nežnemu potegu po repu navzdol). Na ta način smo odvzeli do nekje 70 µl periferne krvi.

Iz zbrane krvi smo izolirali DNA z Bio robotom EZ1 (po postopku v poglavju 5.9.2).

5.11.2 Izolacija DNA

Izolacijo DNA iz krvi, kostnega mozga, vranice, pljuč, jeter, ledvic in dela repa smo opravili na isti dan kot izolacijo celic ali pa naslednji dan.

Izolacija DNA iz krvi in celic KM

Izolacijo DNA iz krvi ali celic KM smo opravili z avtomatsko napravo BIO ROBOT EZ1, s kompletom za izolacijo EZ1 DNA BLOOD 350 µl.

Material:

- a) material, vključen v kompletu
- b) pipete in konice za pipete z vgrajenim filtrom
- d) vibracijsko mešalo (vorteks)

Postopek:

1. Preden smo prižgali napravo BIO ROBOT EZ1, smo preverili, če je v njem vstavljena prava spominska kartica s programom za izolacijo DNA.
2. Po vklopu naprave smo iz nje vzeli nosilec za vzorce in nosilec za kartuše z reagenti.
3. Na nosilec za vzorce smo po navodilih zložili v prvo vrsto mikroeprovete za elucijo, v drugo vrsto nosilce za nastavke in nastavke s filtri ter v četrto vrsto mikroeprovete za vzorce.
4. Mikroeprovete za elucijo smo označili in v mikroeprovete za vzorce prenesli celične suspenzije z volumnom 350 µl (kri smo redčili do omenjene količine in odstranili morebitne strdke; pri izolaciji DNA iz KM smo v omenjeno količino dali do največ 10 milijonov celic).
5. Na nosilec za kartuše smo zložili kartuše z reagenti, ki smo jih predhodno vorteksirali.
6. Oba nosilca smo postavili nazaj v napravo.
7. Zagnali smo avtomatski postopek izolacije DNA po programu za izolacijo iz 350 µl krvi, brez uporabe etanola. Volumen elucije smo nastavili na 50 µl.

Po zaključku izolacije smo shranili izolirano DNA, kartuše in ostale kivete pa zavrgli in očistili konice v napravi.

Izolacija DNA iz nekaterih organov

Izolacijo DNA iz celične suspenzije vranice, pljuč, jeter, ledvic in dela repa smo opravili s pomočjo kompleta Qiagen: DNeasy Blood and Tissue Kit (50).

Material:

- a) material prisoten v kompletu
- b) pipete in konice za pipete z vgrajenim filtrom
- c) vibracijsko mešalo (vorteks)

Postopek:

1. Iz vzorca celične suspenzije strtega organa smo odvzeli 25 μ l in jih prenesli v novo epico, kamor smo že prej dodali 180 μ l pufru ATL. Dodali smo še 20 μ l proteinaze K, mešanico vorteksirali in položili v inkubator (Eppendorf, Thermostat plus) na 56 °C. Mešanico smo pustili v inkubatorju dokler se niso celice in manjši skupki popolnoma lizirali (okoli 30 do 60 minut). Vmes smo večkrat vorteksirali.
2. Pred nadaljevanjem izolacije smo 15 sekund vorteksirali.
3. Dodali smo 200 μ l etanola (96 %) in vorteksirali.
4. Mešanico smo odpipetirali v kolono DNeasy Mini spin, ki smo jo postavili v 2 ml-zbiralno kiveto. Centrifugirali smo eno minuto pri 6.000 xg ter zbiralno kiveto skupaj s tekočino v njej zavrgli.
5. Kolono smo prestavili v novo 2 ml-zbiralno kiveto, dodali 500 μ l pufru AW1 (s prej dodanim alkoholom) ter centrifugirali eno minuto pri 6.000 xg. Ponovno smo zavrgli zbiralno kiveto in tekočino v njej.
6. Kolono smo prestavili v novo 2 ml-zbiralno kiveto, dodali 500 μ l pufru AW2 (s prej dodanim alkoholom) ter centrifugirali 3 minute pri 20.000 xg. Ponovno smo zavrgli zbiralno kiveto in tekočino v njej.
7. Kolono smo prestavili v novo epico.
8. DNA smo eluirali z dodatkom 50 μ l pufru AE v sredino membrane v koloni. To smo inkubirali eno minuto pri sobni temperaturi in centrifugirali eno minuto pri 6.000 xg.
9. Kolono smo zavrgli, epico z izolirano DNA pa shranili.

Določitev koncentracije in čistosti izolirane DNA

Koncentracijo pridobljene DNA in njeno čistost smo preverili na Spektrofotometru ND-1000, NanoDrop. Nukleinske kisline in proteini imajo največjo absorbanco pri 260 in 280 nm, razmerje med tema dvema absorbancama pa se uporablja za oceno čistosti izolacije (Thermo Scientific, 2014).

Razmerje A260/A280 okoli 1.8 je splošno sprejeto kot »čista« DNA. V primeru odstopanja razmerja A260/A280, pomeni, da je vzorec onesnažen s proteinom ali reagentom; nizko razmerje je posledica nižje koncentracije nukleinskih kislin ter prisotnost ostankov reagentov, uporabljenih pri postopku ekstrakcije, visoko razmerje pa ne predstavlja težav (Thermo Scientific, 2014).

Absorbanco pri 230 nm je rezultat kontaminacije z drugimi snovmi, zato se spremlja tudi razmerje v absorbanci pri 260 nm in 230 nm. Vrednosti A260/A230, ki štejejo za »čisto« nukleinsko kislino so običajno v razponu od 2 do 2,2. Če je razmerje nižje, je to lahko posledica ostankov fenola, gvanidina, glikogena, ... snovi, ki jih uporabimo pri postopkih izolacije DNA. Če je razmerje višje, je lahko vzrok v uporabi neprave raztopine pri določanju slepih (angl. *blank*) meritev ali pa umazane merilne naprave (Thermo Scientific, 2014).

5.11.3 PCR v realnem času (PCR-RČ)

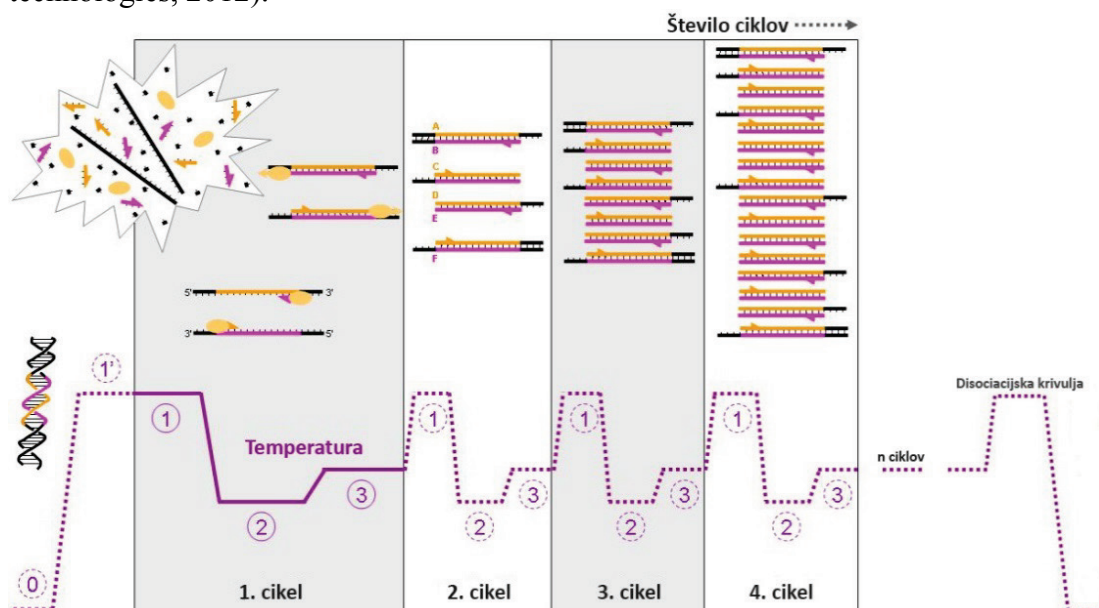
Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. *polymerase chain reaction*) je ena vodilnih metod molekularne biologije, ki je namenjena zaznavanju in določanju količine molekul DNA ali RNA. PCR temelji na *in vitro* pomnoževanju določenega specifičnega, majhnega odseka dednega materiala (običajno od 100 do 1000 baznih parov) s pomočjo encima termostabilne polimeraze DNA. Izbrano zaporedje znotraj matrične DNA ali cDNA lahko v nekaj urah pomnožimo do več kot milijon-krat, pri čemer uporabimo zaporedje specifičnih oligonukleotidov (začetnih oligonukleotidov, ZO), termostabilno DNA polimerazo in verižno ponavljanje termičnih ciklov. Na ta način dobimo zadostno količino nukleinske kisline za nadaljnje molekularne analize, s katerimi potrdimo specifičnost pomnoženega genomskega odseka (Life technologies, 2012, Seme in Poljak, 1996).

Pri klasični PCR običajno poteka zaznavanje in količinska opredelitev pomnoženega zaporedja po končani reakciji (po zadnjem ciklu PCR) z elektroforezo in analizo slike. PCR uporabljajo predvsem za dokazovanje prisotnosti (na primer, prisotnost mikro-organizmov), za genotipizacijo, za sekvenciranje, kloniranje in pri drugih bioloških metodah, medtem ko PCR v realnem času (PCR-RČ, angl. *real-time PCR*) uporabljajo za določanje količine tarčne molekule ali zaporedja. S spremljanjem reakcije med vsakim ciklom pomnoževanja, z določanjem začetne količine genetskega materiala in s primerjavo z znanim standardom lahko uporabniki tako s precejšnjo natančnostjo določijo začetno količino tarčnega zaporedja (zato je poznana tudi pod imenom kvantitativna PCR, angl. *quantitative PCR*, *qPCR*; Life technologies, 2012, Seme in Poljak, 1996).

Pri vsakem ciklu se število kopij pomnoževanega odseka podvoji, za kar pa se mora temperatura kontrolirano spreminjati. Za vezavo ZO na odsek DNA, ki ga želimo pomnoževati, je namreč nujno, da je DNA v enoverižni obliki, to pa dosežemo tako, da jo za kratek čas segrejemo na 95 °C (stopnja imenovana *denaturacija*). Da pride do prileganja ZO na matrico je treba temperaturo ponovno znižati na temperaturo, ki je najbolj primerna za uporabljene ZO (na 37 °C do 58 °C; stopnja *prileganja ZO*), nato pa temperaturo spet prilagoditi pogojem, ki so optimalni za delovanje DNA-polimeraze (stopnja *podaljševanja DNA*), kar je običajno med 70 in 72 °C.

Pri PCR-RČ se ob vsakem omenjenem ciklu izmeri količina DNA s pomočjo fluorescenčnega barvila, ki oddaja signal, ki je neposredno povezan s številom pomnoženih molekul (t.i. amplikoni), ki nastajajo med PCR. Uporabljena fluorescenčna barvila se običajno vežejo na dvoverižno DNA, obarvajo molekule, ki so pritrjene na ZO, ali pa se

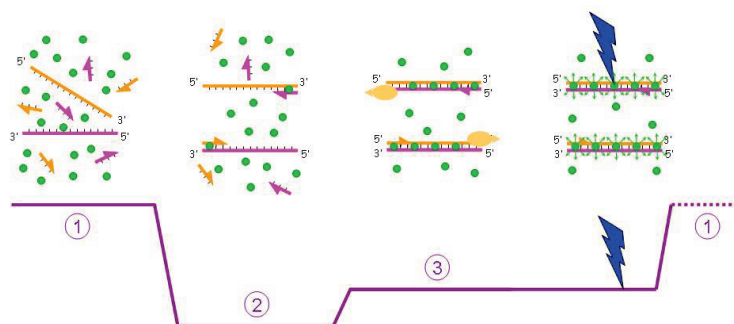
obarvajo sonde, ki se hibridizirajo skupaj s produktom PCR med pomnoževanjem (Life technologies, 2012).



Slika 5.11.3.1: Potek PCR v realnem času. 1. Denaturacija DNA. 2. Prileganje začetnih oligonukleotidov. 3. Podaljševanje DNA. Na koncu ciklov vedno sledi stopnja analize taljenja produktov (prirejeno po Ygonaar, Wikimedia Commons).

Pri naši raziskavi smo uporabili nespecifično fluorescenčno barvilo SYBR® Green I, ki absorbira modro svetlobo ($\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}$) in emitira zeleno svetlobo ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$), ko je vezan na dvoverižno DNA (slika 5.11.3.2), Wikipedia, 2014c. Pri poteku reakcije PCR se barvilo vgradi v novo nastajajočo dvoverižno DNA, zato je njegova fluorescenca, ki jo izmerimo na koncu vsakega koraka podaljševanja, premo sorazmerna s količino nastalega produkta (Čepin, 2011).

Spremembe v fluorescenci pri vsakem ciklu zabeleži naprava za PCR v realnem času. Ob vsakem ciklu zabeleži fluorescenco in jo na koncu prikaže na grafu pomnoževanja (slika 5.11.3.3). Računalniški program preračuna spremembo v signalu fluorescence (ΔRn) po enačbi $\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$, kjer je Rn^+ fluorescenca produkta v kateri koli časovni točki med pomnoževanjem, Rn^- pa fluorescenca ozadja v isti časovni točki (Čepin, 2011).

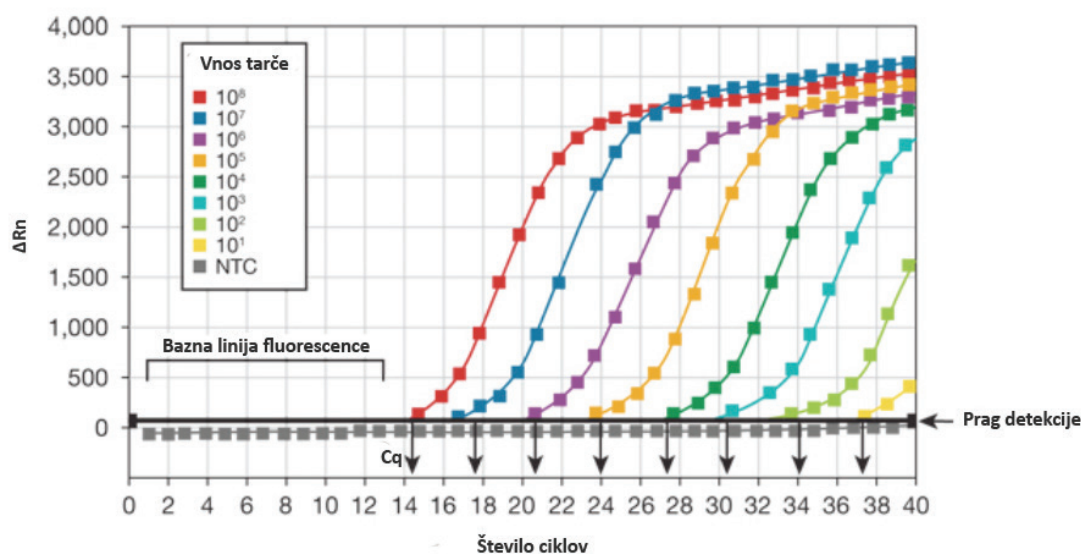


Slika 5.11.3.2: PCR-RČ s SYBR GREEN: 1. Denaturacija. 2. Prileganje začetnih oligonukleotidov. 3. Podaljševanje DNA. Na mestu oznake s puščice naprava izmeri fluorescenco. (Ygonaar, Wikimedia Commons)

Bazna linija PCR-RČ reakcije je raven signala, ki je prisoten v začetnih ciklih PCR (običajno do petnajstega cikla), ko je zaradi nizke začetne količine produkta PCR fluorescenčni signal še tako šibak, da ga ne moremo razlikovati od ozadja (im. tudi lag faza; Čepin, 2011). Omenjen signal lahko enačimo z ozadjem oz. »šumom« reakcije.

Prag detekcije (angl. *threshold*) je raven signala, ki prikazuje statistično značilen dvig nad izračunano bazno linijo in seka eksponentno fazo krivulje pomnoževanja (Čepin, 2011). Določimo ga z namenom, da razlikujemo relevanten signal pomnožitve od ozadja. Običajno PCR naprave avtomatsko postavijo prag detekcije na desetkratni vrednosti standardne deviacije vrednosti fluorescence bazne linije (Life technologies, 2012), vendar lahko prag postavimo tudi ročno (običajno je to najnižji del ravnega dela krivulje). Število ciklov, ki so potrebni za dvig signala fluorescence nad prag detekcije, predstavlja vrednost C_q , cikel pomnoževanja (angl. *quantification cycle*)⁸. C_q vrednost uporabljamo pri izračunavanju količine preiskovane DNA, za vrednost C_q pa vedno upoštevamo povprečno vrednost C_q dveh (ali treh) ponovitev.

Na koncu vsake PCR-RČ reakcije številnim ponovitvam ciklov (običajno med 42 in 45) sledi stopnja disociacijske krivulje. V tej stopnji se z dvigom temperature dvovertična DNA »stali« v enoverižno DNA in fluorescenčno barvilo, ki je v našem primeru SYBR green I, sprosti in fluorescenca upade. To se zgodi pri talilni temperaturi (T_m). Disociacijsko krivuljo (slika 5.11.3.4, A) analiziramo z namenom, da preverimo specifičnost pomnoževanja.



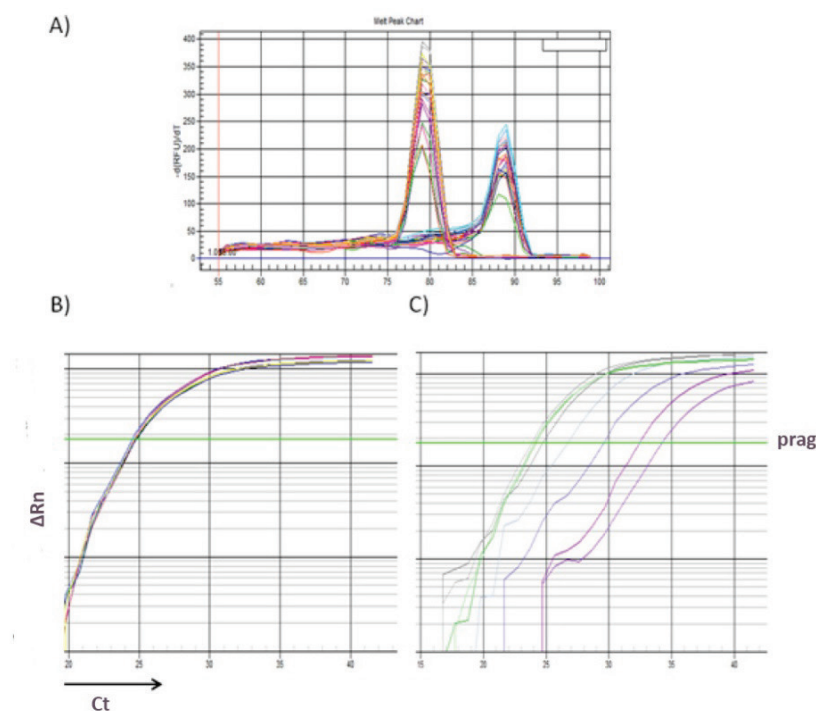
Slika 5.11.3.3: Graf pomnoževanja. (Life technologies, 2012: 3)

⁸ Strokovno poimenovanje vrednosti C_q (cikla pomnoževanja) priporočajo Bustin in sod. (2009), saj različni proizvajalci naprav za PCR-RČ uporabljajo različno nomenklaturu, med njimi C_t (angl. *threshold cycle*), C_p (angl. *crossing point*) in TOP (angl. *take-off point*).

Začetna oligonukleotida Zfy1 in Bcl2

Ko želimo določiti kopije določenega zaporedja DNA ali RNA, uporabimo dva ZO z določenim zaporedjem 16 do 30 nukleinskih baz, ki se bosta prilegala nasprotnima koncema 3' dvojne vijačnice (Raspor, 1996).

Pri naši raziskavi smo uporabili protokol, ki sta ga razvila An in Kang (2013) na podlagi predhodnih raziskav skupine dr. Miwa (Morisaki in sod., 1988) in dr. Schwarzenbergerja (Byrne in sod., 2002). Uporabili smo ZO za mišja gena *Zfy1* in *Bcl2*. *Zfy1* gen je na Y kromosomu, *Bcl2* gen pa je uporabljen kot referenčni gen (ga ni na Y kromosomu), s katerim lahko normaliziramo začetno količino DNA, ki smo jo dodali v vsako reakcijo PCR. Zaporedji ZO za gen *Zfy1* sta 5'-TGGAGAGCCACAAGCTAACCA (F) in CCCA-GCATGAGAAAGATTCTTC (R), za gen *Bcl2* pa 5'-AAGCTGTCACAGAGGGGCTA (F) in 5'-CAGGCTGGAAGGAGAAGATG (R).



Slika 5.11.3.4: A) Disociacijske krivulje več vzorcev z različnimi odstotki moške DNA (vrh pri 78,5°C nakazuje pomnoževanje *Zfy1*, medtem ko vrh pri 88,5°C nakazuje pomnoževanje *Bcl2*). Krivulje pomnoževanja več vzorcev z različnimi odstotki DNA za *Bcl2* (B) in *Zfy1* (C). (An in Kang, 2013, str. 4, sl. 1)

Na grafu pomnoževanja (logaritemski) se krivulje vseh standardov združijo v eno, neodvisno od količine prisotne moške DNA, s čimer vidimo, da je bila DNA enakomerno porazdeljena (An in Kang, 2013), medtem ko se krivulje *Zfy1* z večanjem moške DNA premikajo po premici v levo (slika 5.11.3.4, C).

Umeritvena krivulja

Za določitev odstotek himerizma v vzorcih, smo potrebovali umeritveno krivuljo, ki smo jo pripravili iz DNA, izolirane iz krvi samčka in samičke (starosti 6–12 tednov). Po navodilih An in Kang (2013) smo redčili DNA na koncentracijo 4 ng/μl ter pripravili mešanice, navedene v preglednici 5.11.3.1.

Preglednica 5.11.3.1: Priprava vzorcev za umeritveno krivuljo

	% moške DNA v ženski DNA	Volumen (μl) 4 ng/μl moške DNA	Volumen (μl) 4 ng/μl ženske DNA	Skupni volumen (μl)
1.	0,2	1	499	500
2.	0,5	1	199	200
3.	2,5	5	195	200
4.	12,5	25	175	200
5.	50	100	100	200
6.	87,5	175	25	200
7.	100	200	0	200

Umeritveno krivuljo bi lahko napravili tudi iz DNA kostnega mozga, kar sta preverila tudi An in Kang (2013). Ugotovila sta, da so rezultati pri primerjavi med izolirano DNA iz kostnega mozga in krvi v osnovi konsistentni, le da je bilo običajno manj variacij pri vzorcih iz kostnega mozga, kar sta pripisala ostankom hemoglobina po lizi eritrocitov, ki bi lahko ogrozili čistost genomske DNA v vzorcih iz krvi. Mi smo uporabili DNA pridobljeno iz krvi, saj je bila dovolj čista ($A_{260}/A_{280} = 1,85$).

5.11.3.1 Potek PCR v realnem času

Material:

- a) Power SYBR Green PCR Master Mix (ref. 4367659), podjetja Applied biosystems
- b) Par začetnih oligonukleotidov Zfy1, podjetja Applied biosystems, založna količina 10 nmol
- c) Par začetnih oligonukleotidov Bcl2, podjetja Applied biosystems, založna količina 10 nmol
- d) H₂O brez DNA
- e) plošča s 96vdolbinicami
- f) inštrument za PCR

Priprava delovne koncentracije začetnih oligonukleotidov (ZO):

1. ZO v prahu smo dodali 50 μl H₂O brez DNA. S tem smo pripravili založno koncentracijo (200 μM).
2. Delovna koncentracija je 20X manjša kot založna, zato smo 5 μl založnih ZO razredčili z 95 μl H₂O brez DNA in dobili delovno koncentracijo (10 μM).

Postopek smo izpeljali po navodilih An in Kang, 2013:

1. Pripravili smo vzorce, ki smo jih razporedili na plošči s 96 vdolbinicami. Ploščo smo položili v inštrument za PCR ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System. Skupni reakcijski volumen (20 μl) v vdolbinicah je vseboval 400 nM ZO in 5 μl genomske DNA. Vzorce in standarde smo porazdelili v dvojnikih ali trojnikih.

2. V inštrumentu za PCR smo nastavili protokol, ki je zagotovil naslednje pogoje: 10 minut na 95°C (SYBR Green Master Mix, ki smo ga uporabili potrebuje 10 minut, da se aktivira DNA polimeraza), 42 ciklov po 95°C za 10 sekund, 25 sekund po 58°C in 15 sekund po 72°C ter zaključek z disociacijo.

3. V računalniškem programu smo po PCR-RČ odčitali Cq ter izračunali delta Cq vrednosti:

$$\Delta Ct(Cq^{Zfy1} - Cq^{Bcl2}) \quad \dots (5.11.3.1.1)$$

Izražanje Zfy1 smo izračunali kot vrednost:

$$2^{-\Delta Cq} \quad \dots (5.11.3.1.2)$$

4. Z uporabo $2^{-\Delta Cq}$ znanih vrednosti mešanic moške in ženske DNA smo določili umeritveno krivuljo in jo uporabili pri odčitavanju vrednosti vzorcev z neznanimi količinami moške DNA.

5.11.3.2 Izboljšave PCR v realnem času

Uporaba plošče s 384 vdolbinicami

Zaradi številnih ponovitev reakcij PCR-RČ smo se odločiti preiti na uporabo plošče s 384 vdolbinicami. Volumen v posamezni vdolbinici se je tako razpolovil na 10 µl ter s tem tudi poraba reagentov. Zamenjali smo tudi inštrument za PCR in prešli na Viia™ 7, podjetja Life technologies.

Sprememba protokola ciklov

Po posvetu z dr. Natašo Toplak (Omega d.o.o.) smo prilagodili časovne okvire posameznih ciklov: 10 minut na 95 °C, 45 ciklov po 95 °C za 15 sekund, 30 sekund po 58 °C in 30 sekund po 72 °C (naprava ne more zajemati podatkov, če stopnje niso dolge vsaj 30 sekund) ter zaključek z disociacijsko krivuljo.

Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov

Preizkusili smo delovanje ZO na 0,2 % in 12,5 % moški DNA v različnih koncentracijah: 400 nM, 200 nM, 100 nM in 50 nM.

Test učinkovitosti

Testirali smo učinkovitost PCR-RČ z 200 nM ZO in 400 nM ZO. Pripravili smo razredčitve vzorcev 100 % moške DNA: 10x, 100x, 1000x in 10000x. Po reakciji smo izračunali naklon (S, angl. *slope*) in učinkovitost (E, angl. *efficiency*). Slednjo smo izračunali po formuli:

$$E = (10^{-1/s} - 1) \quad \dots (5.11.3.2.1)$$

S je naklon premice, ki ga izračunamo iz dobljenih Cq vrednosti pri različnih redčitvah DNA (logaritmiranih). Učinkovitost 0 oziroma 0 % pomeni, da do pomnoževanja ni prišlo in, učinkovitost 1 oziroma 100 %, pa pomeni, da so se vse tarčne molekule v enem ciklu podvojile. 100% učinkovitost pomnoževanja ustreza naklonu umeritvene krivulje $s = -3.33$, kar pomeni, da se količina DNA z vsakim ciklom točno podvoji, kar pa je v praksi v bioloških vzorcih zelo redek pojav (Giulietti, 2001).

Optimiziran postopek PCR v realnem času za določanje himerizma

Po optimizaciji postopka PCR-RČ smo odstotek moške DNA v vzorcih KM, vranice, pljuč, jeter, ledvic in kožnega dela repa določali s 400 nM začetnimi oligonukleotidi Zfy1 in Bcl2 (F in R) na plošči z 384 vdolbinicami in napravi Viia™ 7 podjetja Life technologies.

Uporabljeni časovni okviri ciklov: 10 minut na 95 °C, 45 ciklov po 95 °C za 15 sekund, 30 sekund po 58 °C in 30 sekund po 72 °C ter zaključek z disociacijsko krivuljo.

Preglednica 5.11.3.2.1: Priprava vdolbinic za PCR-RČ na plošči z 384 vdolbinicami

	V (μl) v posamezni vdolbinici
2x SYBR green MM	5
H₂O	1,7
400 nM F ZO (Zfy1 ali Bcl2)	0,4
400 nM R ZO (Zfy1 ali Bcl2)	0,4
DNA	2,5
Skupaj	10

Preglednica 5.11.3.2.2: Nastavitev ciklov na inštrumentu za PCR Viia™ 7

10 minut	95 °C	
15 sekund	95 °C	45 ciklov
30 sekund	58 °C	
30 sekund	72 °C	
disociacijska krivulja		

6 REZULTATI

6.1 ŠTEVILO IN VIABILNOST PRIDOBLENIH CELIC KM

S postopkom spiranja kosti smo izolirali od 70 do 90 milijonov celic, kar je veliko manj kot pri postopku trenja kosti. Pri začetnih poskusih trenja kosti smo uspeli izolirati 160 milijonov celic KM, kasneje, z nakupom nove terilnice in pestila, pa smo s trenjem izolirali kar 300 do 400 milijonov celic KM.

Spodaj so navedeni rezultati, ki smo jih pridobili pri posameznem načinu izolacije celic KM. Pod točkama a) in b) so navedeni rezultati prvega poskusa postopkov izolacije, pod točko c) pa so navedeni rezultati po izpopolnjenem postopku ter lizi eritrocitov.

a) Metoda spiranja kosti:

Št. vseh izoliranih celic KM = 72×10^6

Št. živih celic KM = $70,8 \times 10^6$

Št. mrtvih celic KM = $1,2 \times 10^6$

Viabilnost = <95%

b) Metoda trenja kosti:

Št. vseh izoliranih celic KM = $159,2 \times 10^6$

Št. živih celic KM = $151,5 \times 10^6$

Št. mrtvih celic KM = $7,7 \times 10^6$

Viabilnost = 95,1 %

Metoda z encimsko razgradnjo⁹:

Št. vseh izoliranih celic KM = $7,2 \times 10^6$

Št. živih celic KM = $4,8 \times 10^6$

Št. mrtvih celic KM = $2,4 \times 10^6$

Viabilnost = 66,6 %

c) Korigirana metoda trenja kosti z lizo eritrocitov:

Štetje celic takoj po trenju

Št. vseh izoliranih celic KM = 406×10^6

Št. živih celic KM = 344×10^6

Št. mrtvih celic KM = 62×10^6

Viabilnost = 84,7 %

Štetje celic po lizi eritrocitov in filtriranju

Št. vseh izoliranih celic KM = $104,6 \times 10^6$

Št. živih celic KM = $97,5 \times 10^6$

Št. mrtvih celic KM = $7,1 \times 10^6$

Viabilnost = 93,2 %

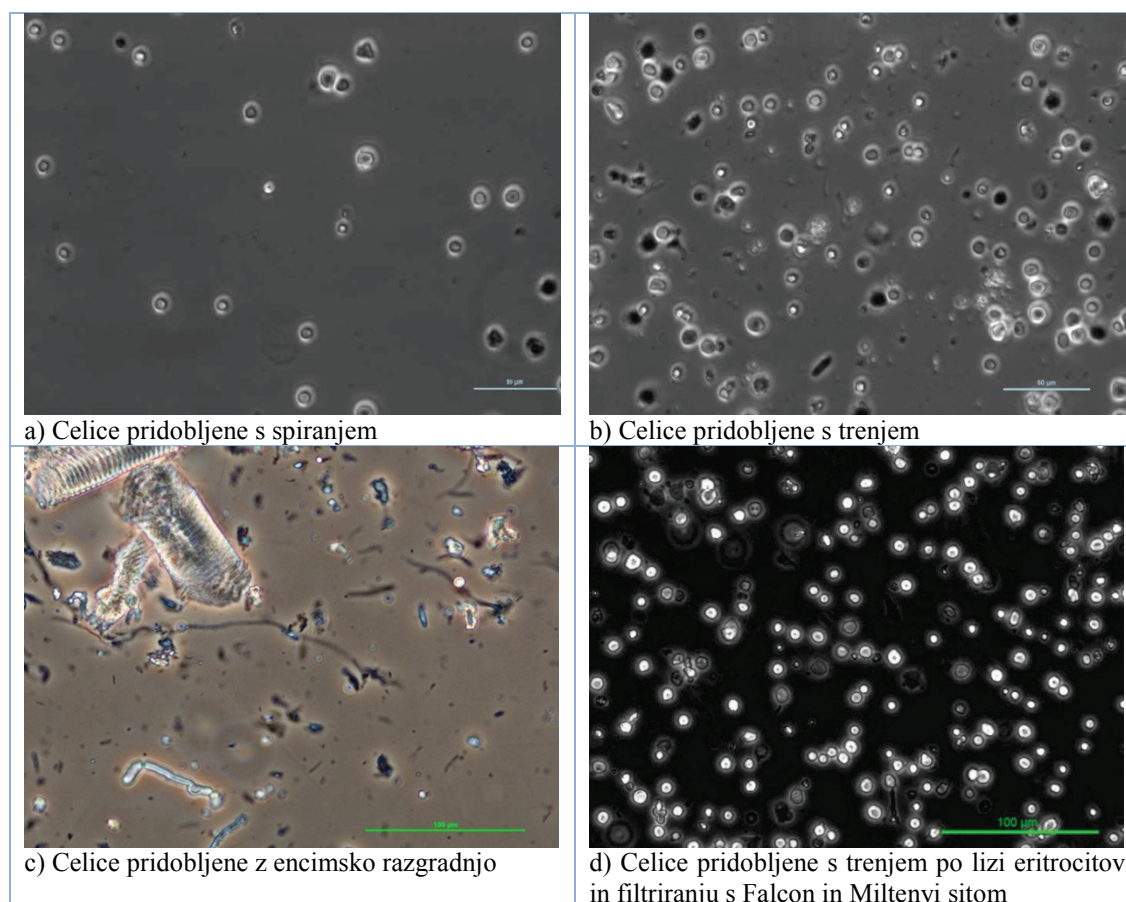
Sprva smo celice preštevali ročno, s hemocitometrom, kasneje smo jih preštevali z avtomatsko napravo Vi-CELL. Preverili smo, ali se ročno štetje ujema z avtomatskim ter ugotovili, da se. Večja razlika se je pokazala le pri določanju viabilnosti, ki je bila lahko pri meritvah z Vi-CELL do 10 % nižja (kot kaže, je bilo to odvisno od prisotnosti celičnega debrija, ki ga je Vi-CELL lahko zaznal kot mrtve celice). Viabilnost izoliranih

⁹ Za postopek z encimsko razgradnjo smo uporabili le zdrobljene kosti, ki so ostale v terilnici po postopku trenja.

celic KM smo zato raje določali s pretočnim citometrom, ki je bila za jedrne celice v izbranih vratih (R1) vedno nad 92 %.

6.2 MORFOLOGIJA PRIDOBLENIH CELIC

Najlepši celični pripravek smo dobili pri postopku spiranja kosti, najslabši in najmanj primeren postopek za presaditev pa je bil tisti, ki je vključeval uporabo encima kolagenaze in dispaze, saj je vseboval več delcev kosti. Pripravek celic, pridobljen s postopkom trenja kosti, je prav tako vseboval delce kosti, vendar si bili ti manjši in jih je bilo vidno manj, vsebnost teh delcev pa se je še zmanjšala, ko smo celično suspenzijo filtrirali vsaj dva do trikrat preko 40 µm-najlonskih sit (podjetja Falcon).



Slika 6.2.1: Mikroskopski posnetki pripravkov izoliranih celic KM, posneti z mikroskopom Nikon ECLIPSE Ti-S in programom NIS-Elements D.

Če število pridobljenih celic ne bi bilo pomembno, bi se odločili za postopek spiranja kosti (slika 6.2.1, a), vendar pa smo se za presaditev celic KM pri poskusu odločili uporabiti postopek trenja, ker z njim pridobimo več celic KM (in s tem prihranimo na številu uporabljenih poskusnih živali), je v splošnem hitrejši in po Haylocku in sod. (2007) vsebuje več krvotvornih matičnih celic, ki so v endostu.

Da smo iz celične suspenzije odstranili čim več celičnega debrija in delcev kosti, smo izolirane celice KM vsakič vsaj dvakrat prefiltrirali preko 40 µm-najlonskega sita (slika

6.2.1, b in slika 6.2.2, levo). Šele po zaključku pilotskega poskusa smo našli 30 μm -sita podjetja Miltenyi, ki smo jih testirali (poglavje 6.5.5) in jih priporočamo za uporabo tik pred prenosom celične suspenzije v brizge (slika 6.2.1, d).



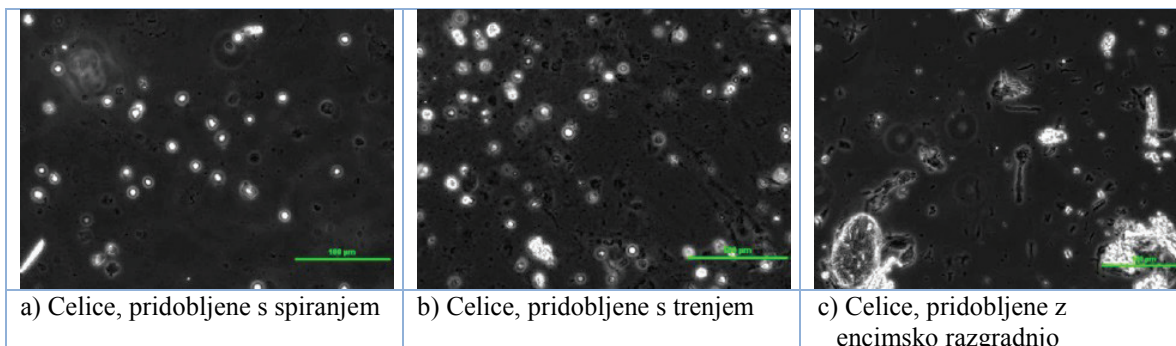
Slika 6.2.2: Pri postopku trenja je zelo pomembno celično suspenzijo vsaj dvakrat dobro prefiltrirati skozi 40 μm -sito (levo), tik pred prenosom v brizgo pa še skozi 30 μm -sito (desno; Miltenyi Biotec).

6.3 REZULTATI ZAMRZNITVE CELIC

Poskus je pokazal, da postopek zamrznitve zelo zmanjša število celic, saj smo po zamrznitvi in odmrznitvi v celični suspenziji izgubili kar dve tretjini celic. Zanimivo je, da pri pridobitvi celic z encimsko razgradnjo do upada celic ni prišlo.

Preglednica 6.3.1: Število celic pred in po odmrznitvi

Način pridobitve celic	Število sveže pridobljenih celic	Število celic po odmrznitvi
Spiranje	Št. pridobljenih celic KM = $70,8 \times 10^6$ Št. mrtvih celic KM = $1,2 \times 10^6$ Viabilnost = $<95\%$	Št. pridobljenih celic KM = $20,1 \times 10^6$ Št. živih celic KM = $18,9 \times 10^6$ Št. mrtvih celic KM = $1,2 \times 10^6$ Viabilnost = 94%
Trenje	Št. pridobljenih celic KM = $151,5 \times 10^6$ Št. mrtvih celic KM = $7,7 \times 10^6$ Viabilnost = $94,9\%$	Št. pridobljenih celic KM = $64,6 \times 10^6$ Št. živih celic KM = $52,5 \times 10^6$ Št. mrtvih celic KM = $12,1 \times 10^6$ Viabilnost = $81,2\%$
Trenje z encimsko razgradnjo	Št. pridobljenih celic KM = $4,8 \times 10^6$ Št. mrtvih celic KM = $2,4 \times 10^6$ Viabilnost = 50%	Št. pridobljenih celic KM = $8,2 \times 10^6$ Št. živih celic KM = $4,7 \times 10^6$ Št. mrtvih celic KM = $3,5 \times 10^6$ Viabilnost = $57,3\%$

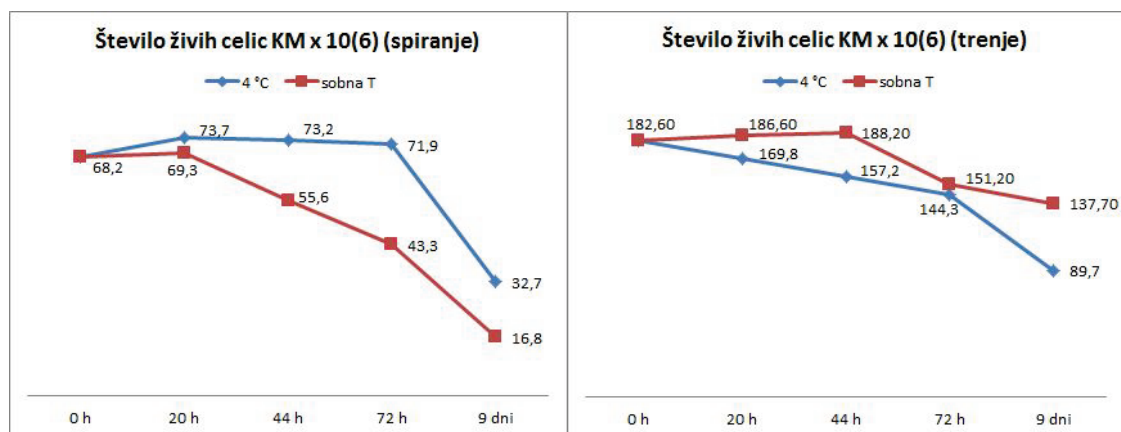


Slika 6.3.1: Mikroskopski posnetki celic po odmrznitvi.

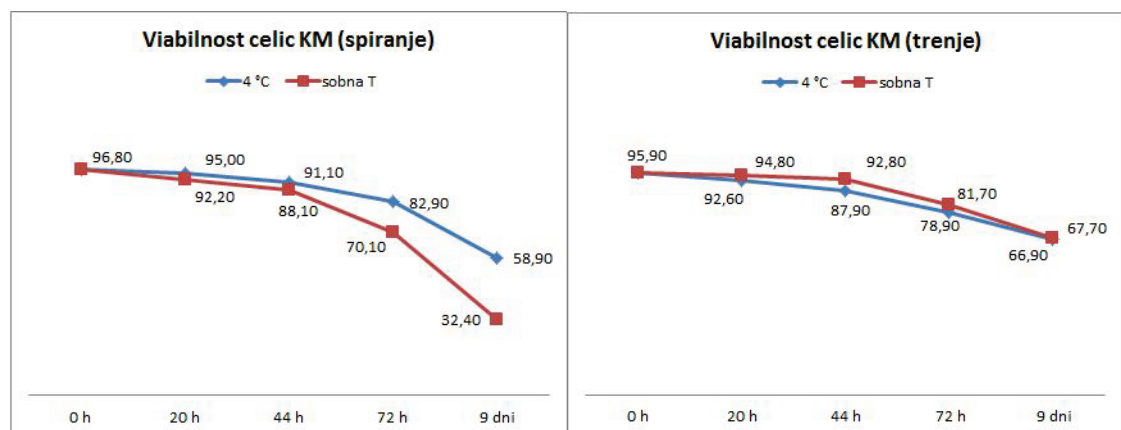
Zaradi velike izgube števila celic po odmrznitvi (dveh tretjin) smo se odločili, da pri presaditvah KM postopka zamrzovanja celic ne bomo uporabljali.

6.4 ŠTETJE CELIC PO SHRANITVI NA 4°C IN NA SOBNI TEMPERATURI

Celično suspenzijo smo spremljali prve tri dni in deveti dan po izolaciji. Celice so se po številu in viabilnosti dobro ohranile. Število celic je lahko sprva celo naraslo in šele nato upadlo. Podobno neznačilno rast in nato padec števila so opazili tudi pri celicah CD34+ v odmrznjeni popkovnični krvi (Ifko, 2011, Laroche in sod., 2005).



Slika 6.4.1: Število živih celic KM po enem, dveh treh in devetih dneh v mediju RPMI+.



Slika 6.4.2: Viabilnost celic KM po enem, dveh treh in devetih dneh v mediju RPMI+.

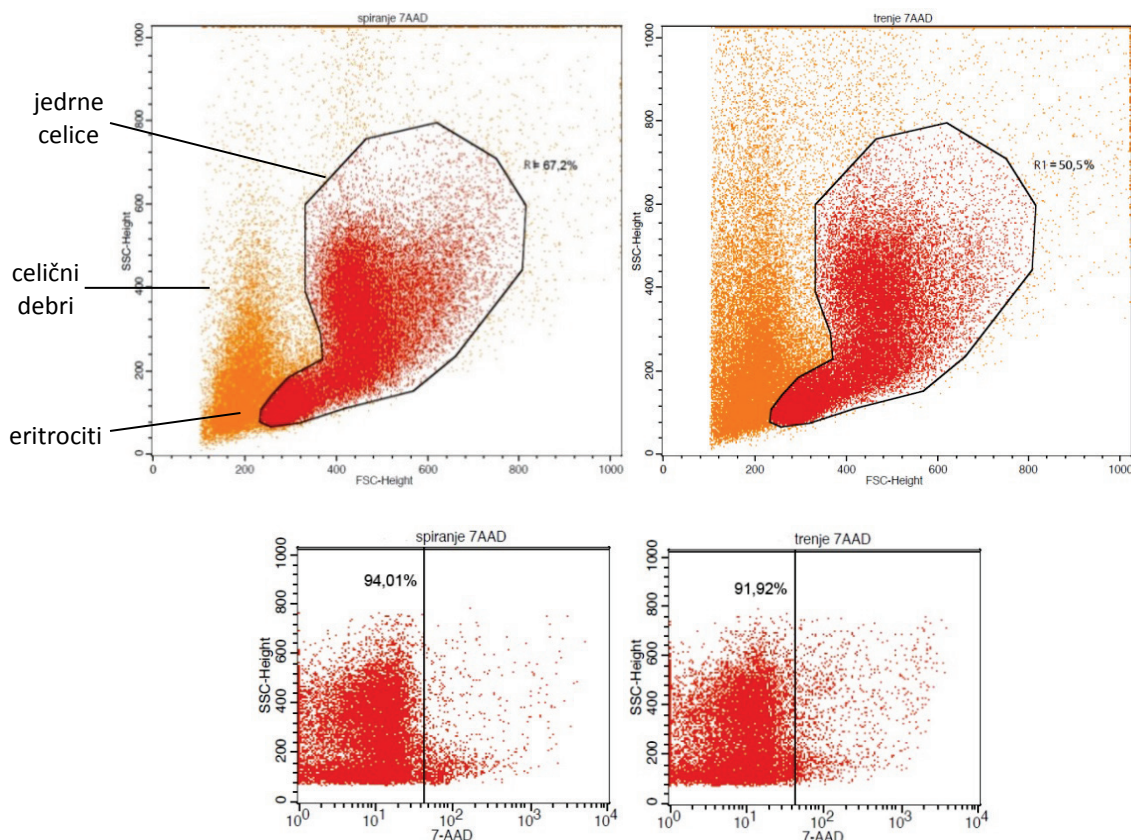
6.5 REZULTATI PRETOČNE CITOMETRIJE

6.5.1 Določanje deleža jedrnih celic in njihove viabilnosti

S pretočnim citometrom smo analizirali celice KM, ki smo jih pridobili z dvema različnima postopkoma – s spiranjem in trenjem. Celice smo pred analizo zmešali z barvilom 7-AAD, ki obarva le mrtve celice.

V postavljenih vratih R1 smo se omejili na populacijo jedrnih celic in določili viabilnost celic. Pri pripravku celic KM pridobljenih s spiranjem je bilo med vsemi izoliranimi celicami KM 67,2 % jedrnih celic, pri pripravku celic, pridobljenih s trenjem pa je bilo jedrnih celic 50,5 % (slika 6.5.1.1). Videli smo, da pri postopku trenja v celični suspenziji ostane nekaj več celičnega debrija kot pri postopku spiranja, a je bila količina debrija še

zmeraj v sprejemljivih okvirih (še posebej pri kasnejših postopkih, ko smo celično suspenzijo še bolje prefiltrirali). Viabilnost jedrnih celic je bila v obeh primerih več kot devetdeset odstotna.

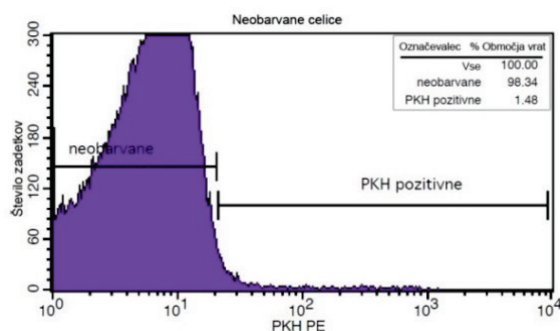


Slika 6.5.1.1: Sliki na levi strani prikazujeta analizo celic KM, pridobljenih s spiranjem kosti, sliki na desni pa prikazujeta analizo celic KM, pridobljenih s trenjem kosti. Zgornji sliki prikazujeta jedrne celice v označenem območju R1 glede na vse izolirane celice KM. Pri postopku spiranja je jedrnih celic 67,2 %, pri postopku trenja pa 50,5 %. Spodnji sliki prikazujeta viabilnost le jedrnih celic, ki je v obeh primerih nad 90 %.

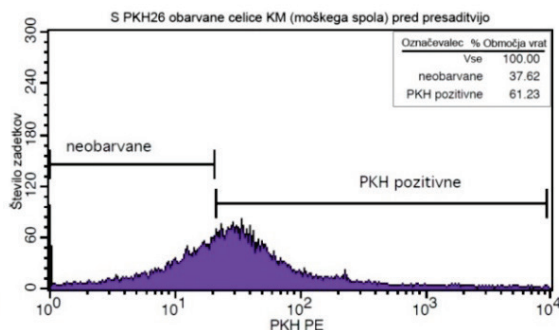
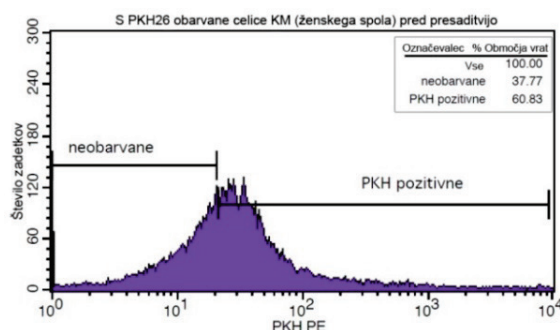
6.5.2 Barvanje celic KM z barvilom PKH26

Po 100 milijonov celic KM samca in samic, ki smo jih izolirali iz kosti po postopku trenja, smo ločeno obarvali z rumeno-oranžnim barvilom PKH26. Po končanem postopku barvanja nam je ostalo le 13,1 milijonov celic KM samca in 10,6 milijonov celic KM samice (do 90 % izguba celic). Te celice smo v 200 μ l PBS s heparinom presadili prejemnicama M 3 (ta je prejela celice samca) in M 4 (ta je prejela celice samice).

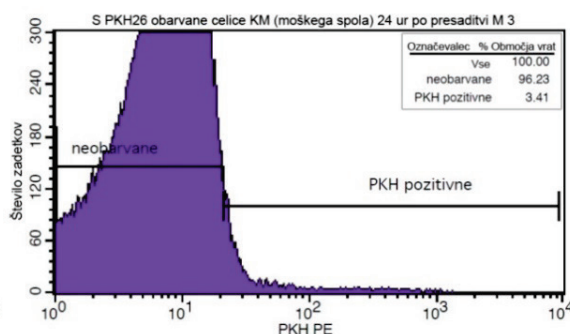
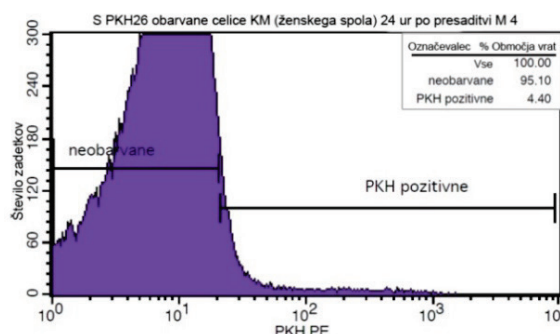
Analiza celic pred presaditvijo je pokazala, da barvanje celic ni bilo povsem uspešno. Iz neznanega razloga se je obarvalo le 60 % celic v območju vrat R1. Pri postopku barvanja je prišlo do lepljenja celic v skupke, zaradi česar smo verjetno izgubili precejšnje število celic.



Slika 6.5.2.1: Celice KM smo pred barvanjem analizirali in preverili postavljeno mejo. Analiza je pokazala 1,48 % lažno pozitivnih celic, ki smo jih odšteli pri nadaljnji analizi barvanih celic pred in po presaditvi.



Slika 6.5.2.2: Analiza celic KM s pretočnim citometrom po barvanju s PKH26 pred presaditvijo. S PKH26 smo pobarvali 59,3 % celic KM ženskega spola (levo) in 59,7 % celic KM moškega spola (desno).



Slika 6.5.2.3: Analiza celic KM s pretočnim citometrom 24 ur po presaditvi 10,6 milijonov celic KM darovalke ženskega spola in 13,1 milijonov celic KM darovalca moškega spola, ki so bile obarvane s PKH26. V KM prejemnice M 3 smo zaznali 1,9 % obarvanih celic moškega darovalca (desno) in 2,9 % obarvanih celic ženske darovalke v KM prejemnice M 4 (levo).

En dan po presaditvi s PKH26 obarvanih celic KM smo izolirali celice KM prejemnic M 3 in M 4 ter jih analizirali s pretočnim citometrom. Z analizo smo zaznali 1,9 % obarvanih celic moškega darovalca v KM prejemnice M 3 in 2,9 % obarvanih celic ženske darovalke v KM prejemnice M 4 (slika 6.5.2.3).

Preizkus presaditve obarvanih celic nas ni privedel do konkretnih zaključkov, saj bi za zanesljive rezultate morali še bolj natančno nastaviti prag za ločevanje obarvanih celic od neobarvanih ter optimizirati postopek barvanja celic s PKH26, da bi bilo barvanje čim bolj uspešno. Za nadaljevanje raziskav z označevanjem celic s PKH26 se nismo odločili in smo himerizem raje ugotavljali na podlagi analize prisotnosti Y-kromosoma z metodo PCR-RČ.

6.5.3 Določanje deleža jedrnih celic in njihove viabilnosti po lizi eritrocitov

V želji, da bi iz celične suspenzije odstranili eritrocite, smo opravili poskus, pri katerem smo želeli določiti optimalen čas za lizo eritrocitov v suspenziji mišjih celic KM. Opazovali smo, kako postopek vpliva na število in viabilnost jedrnih celic v suspenziji. Da bi natančno določili primeren čas lize celic KM, smo opravili lizo eritrocitov v različnih časovnih okvirih: 3 minute, 5 minut, 7,5 minut ter 10 minut. Sledili smo navodilom za lizo eritrocitov (poglavje 5.6), določili viabilnost na pretočnem citometru z uporabo barvila 7-AAD (poglavje 5.7.1) ter celice šteli z avtomatskim števcem Vi-CELL (poglavje 5.2.2).

Poskus je potrdil, da je najbolje opraviti lizo eritrocitov v presadku KM v časovnem okviru treh minut, kar se ujema s priporočili proizvajalca uporabljenega pufera za lizo (PD Pharm Lyse). Ker barvanju sledi še centrifugiranje in spiranje celičnega pripravka, smo celice pred lizo prešteli in nato preverili izgubo celic po postopku. Pred lizo je bilo v pripravku 39–44 % eritrocitov, 37–48 % jedrnih celic in 10–20 % celičnega debrija. Po postopku lize je bilo v suspenziji okoli 72 % jedrnih celic, 11 % eritrocitov in 10–20 % celičnega debrija (preglednica 6.5.3.1). S postopkom lize smo odstranili 75 % eritrocitov.

Preglednica 6.5.3.1: Analiza celičnih suspenzij KM po opravljeni lizi eritrocitov v različnih časovnih okvirih¹⁰

Ime vzorca	Odstotek jedrnih celic	Odstotek eritrocitov
Brez lize, obarvano s 7-AAD	37 %; 41 %	44 %; 43 %
Brez lize	47,8 %	39%
Liza 3 min, brez centrif. in spiranja	62 %	18 %
Liza 3 min, 5 min centrif. in spiranje	72 %	11,4 %
Liza 5 min, 5 min centrif. in spiranje	72 %	11 %
Liza 7,5 min, 5 min centrif. in spiranje	71 %	12,5 %
Liza 10 min, 5 min centrif. in spiranje	69 %	13,6 % ¹¹

Celice smo pred in po lizi eritrocitov prešteli in določili odstotek izgube vseh celic KM (preglednica 6.5.3.2). Zanimalo nas je, koliko celic KM izgubimo z lizo in koliko s samim postopkom centrifugiranja in spiranja, zato smo primerjali izgubo v obeh primerih in ugotovili, da se je število celic v suspenziji zmanjšalo po postopku lize za kar 60 % (preglednica 6.5.3.2), po samem spiranju pa okoli 25 % vseh celic KM. Slednja izguba je prisotna pri vsakem spiranju celic in tudi v splošnem otežuje raziskave.

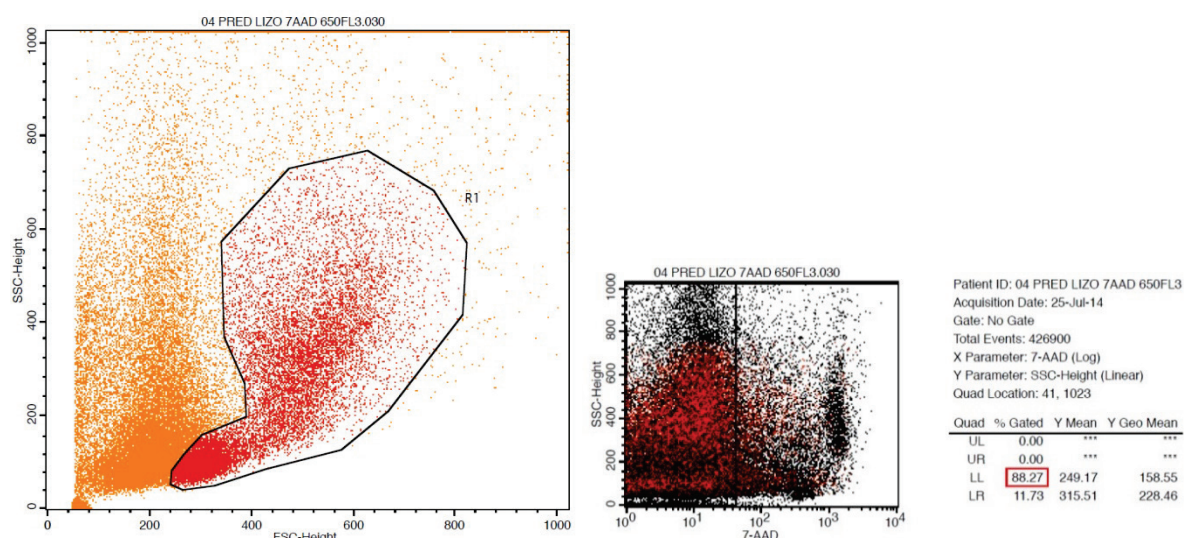
¹⁰ Vsak vzoreček je v začetku vseboval 3,8 milijonov celic KM.

¹¹ V času odstotek eritrocitov glede na celoto raste, verjetno zato, ker pufer čez čas lizira tudi druge jedrne celice.

Preglednica 6.5.3.2: Štetje celic KM z Vi-CELL pred in po postopku lize eritrocitov in po postopku spiranja (vključuje enkratno centrifugiranje in spiranje)

	Liza eritrocitov	Spiranje
Število celic pred postopkom	$3,8 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$
Št. vseh celic po postopku	$1,52 \times 10^6$	$2,83 \times 10^6$
Št. živih celic po postopku	$1,39 \times 10^6$	$2,48 \times 10^6$
Št. mrtvih celic po postopku	$0,13 \times 10^6$	$0,36 \times 10^6$
Viabilnost po postopku	91 %	87,6%
Število izgubljenih celic po postopku	$2,28 \times 10^6$ (= 60 % manj celic)	$0,97 \times 10^6$ (= 25,5% manj celic)

S pretočnim citometrom smo določili tudi viabilnost jedrnih celic pred lizo, ki je bila 93,9 %, in viabilnost jedrnih celic po tri minutni lizi, ki je bila 96,7 %. Preglednica 6.5.3.2 prikazuje nekoliko nižjo viabilnost, izmerjeno z Vi-CELL. Razlog nižjega rezultata viabilnosti je v tem, da Vi-CELL določa viabilnost celotni celični suspenziji, s pretočnim citometrom pa smo določali viabilnost le izbrani populaciji jedrnih celic v vratih R1. Enako viabilnost kot z Vi-CELL smo lahko dobili, če smo jo merili brez postavljenih vrat, torej vse dogodke, zaznane s pretočnim citometrom. Ko smo z Vi-CELL na vzorcu dobili 87,4 % viabilnost, smo s pretočnim citometrom brez vrat dobili 88,27 % (slika 6.5.3.1).



Slika 6.5.3.1: Določanje viabilnosti celotnega vzorca brez vrat. Viabilnost (desno) pretočni citometer meri v celotnem kvadratu (levo), ne le v vratih R1.

6.5.4 Test medijev za izolacijo celic KM

Celice smo testno izolirali iz kosti s štirimi različnimi mediji: RPMI-1640, RPMI-1640 s heparinom (10E/ml), RPMI-1640 s FBS (2 %) in s fiziološko raztopino. Opazovali smo sam potek trenja kosti, ali se izplavljene celice med seboj lepijo, kako poteka centrifugiranje in spiranje itn.

Rezultat tega poskusa je bila ugotovitev, da dodatek heparina v medij povzroči, da postane celotna celična suspenzija bolj gostljata, da se lepi na stene konic pipet in da se slabo meša s PBS. Ko smo na kapljico PBS kanili kapljico celične suspenzije s heparinom, je slednja

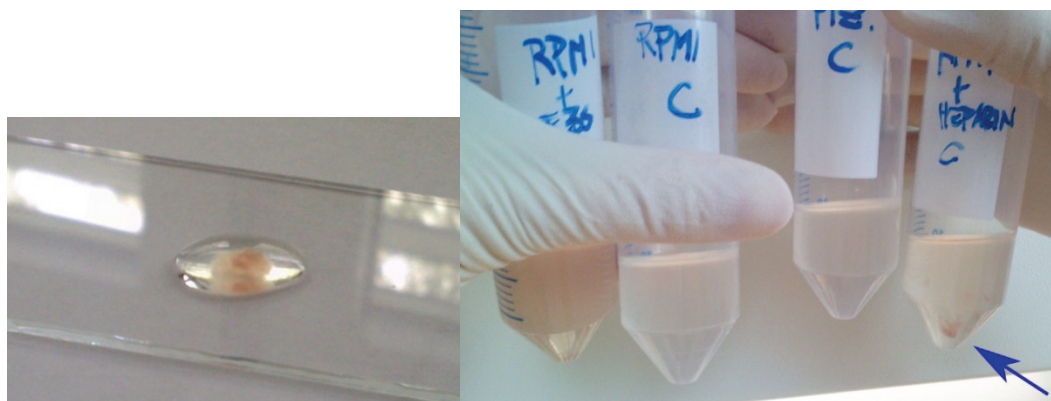
ostala v obliki kapljice in se ni razlila, kot so se celične suspenzije z drugimi mediji (slika 6.5.4.1, levo). Enaka gostljatost se je pojavljala tudi pri centrifugiranju in spiranju v centrifugirki (slika 6.5.4.1, desno). Podobne težave z lepljivostjo smo imeli v preteklih pripravah celičnih suspenzij za presaditev celic KM, saj smo na podlagi izkušenj drugih raziskovalcev heparin vedno dodali v medij za izolacijo celic.

Zgoraj omenjene gostljatosti oz. lepljivosti pri ostalih treh preizkušenih medijih ni bilo – vsi pripravki so bili primerno tekoči in se niso lepili na stene konic pipet. Pri štejeju z Vi-CELL in pri analizi s pretočnim citometrom se je za slabšo izkazala tudi uporaba fiziološke raztopine. V celični suspenziji, izolirani s fiziološko raztopino, je bilo le 34,4 % jedrnih celic (v vratih R1), medtem ko jih je bilo pri RPMI-1640 51,6 % jedrnih celic, pri RPMI-1640 s heparinom 45,6 % in pri RPMI-1640 s FBS 48,9 %. Po teh rezultatih je najboljši medij za izolacijo celic KM RPMI-1640.

Spremljali smo tudi število celic v usedlini in supernatantu ter viabilnost celic. Ali je za izolacijo bolje uporabiti samo RPMI-1640 ali je bolje dodati FBS, po opravljenem poskusu ni najbolj jasno, ker so rezultati izolacije videti precej podobni. Pri dodanem FBS je bila viabilnost celic za nekaj odstotkov višja in višji odstotek celic se je pri centrifugiranju usedel v usedlino kot pri ostalih medijih, kar pomeni manj izgub celic pri postopkih izolacije celic KM. Po dobljenem rezultatu, bi se lahko odločili za uporabo RPMI-1640 z dodanim FBS, vendar obstaja možnost, da bi lahko sam FBS negativno vplival na vsaditev celic KM v izbrane BALB/c miši, zato ga v bodoče v medij za izolacijo ne nameravamo dodajati.

Preglednica 6.5.4.1: Primerjava števila celic in viabilnosti pri izolaciji celic z različnimi mediji (izmerjeno z Vi-CELL)

Medij	Število vseh celic v supernatantu; viabilnost	Število vseh celic v usedlini; viabilnost	Odstotek celic v usedlini
RPMI-1640	28,6 x 10 ⁶ ; 38,1 %	30 x 10 ⁶ ; 85,6 %	51,1%
RPMI-1640 s heparinom	29,6 x 10 ⁶ ; 46,9 %	38 x 10 ⁶ ; 80,3 %	56,2 %
RPMI-1640 s FBS	36,6 x 10 ⁶ ; 47,9 %	78,9 x 10 ⁶ ; 88,3 %	68,3 %
fiziološka raztopina	18,4 x 10 ⁶ ; 41,6 %	17,9 x 10 ⁶ ; 77,7 %	49,3 %

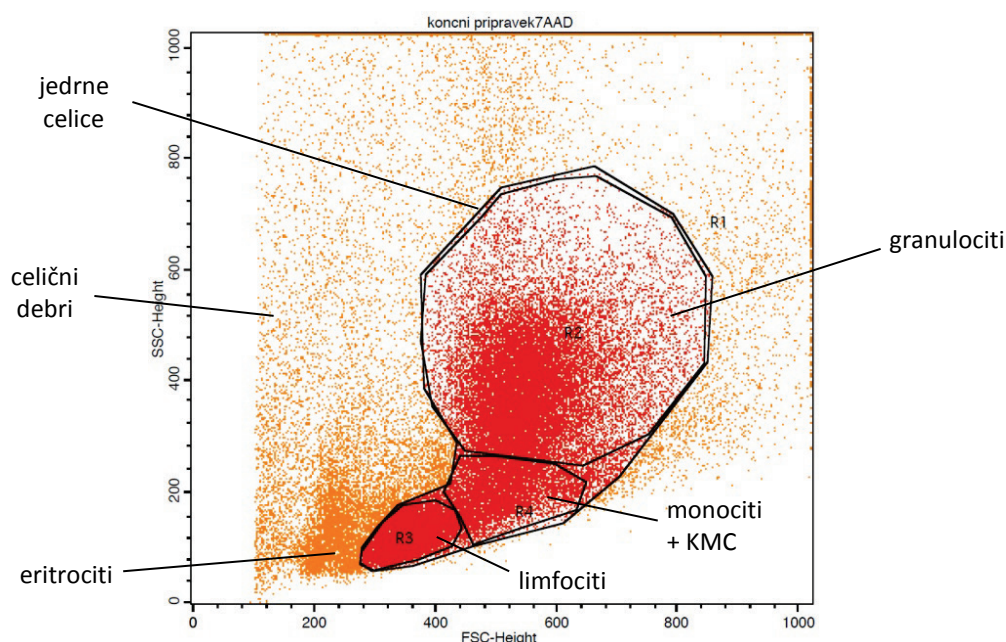


Slika 6.5.4.1: Ko medij vsebuje heparin, se celična suspenzija slabo meša s PBS in je zelo lepljiva/gostljata (levo). Podobno zlepljanje v kosme smo opazili tudi pri centrifugiranju in spiranju (desno, modra puščica).

Ko smo po 24 urah pod mikroskopom opazovali celice, izolirane v različnih medijih, v kombinaciji različnih celic, med njimi ni bilo večjih razlik, le celice s heparinom so bile videti bolj samostojne – manj v skupkih. Antikoagulacijski učinek, ki smo ga pričakovali, smo na celicah lahko opazili šele po enem dnevu in ne takoj.

6.5.5 Korekcija priprave presadka

Po uspešni izolaciji celic KM iz kosti in lizi eritrocitov z dvakratnim filtriranjem preko 40 μm –najlonskih sit in dvakratnim spiranjem smo 114,3 milijonov celic v 500 μl prefiltrirali preko Miltenyi sita (30 μm). Po filtriranju je v suspenziji ostalo 104,6 milijonov celic v 630 μl (suspenzija je bolj razredčena zaradi spiranja sita pred in po filtriranju), kar pomeni, da smo s filtriranjem izgubili 8,5 % celic.



Slika 6.5.5.1: Analiza pripravljenega presadka celic KM po lizi eritrocitov in filtriranju z Miltenyi sitom. Vrata R1 predstavljajo jedrne celice KM (73,8 %), vrata R2 predstavljajo granulociti (36,5 %), vrata R3 limfociti (23,7 %) in vrata R4 monociti (11 %).

Prefiltrirani presadek smo pregledali tudi z mikroskopom (slika 6.2.1, d) in analizirali s pretočnim citometrom. V presadku je bilo 73 % jedrnih celic, 12 % eritrocitov in 15 % celičnega debrija (slika 6.5.5.1). Viabilnost jedrnih celic v vratih R1 je bila 92,5 %.

Ker smo primerna sita za filtriranje celične suspenzije z veliko gostoto in majhnim volumnom našli šele po vseh opravljenih presaditvah KM, smo jih v okviru te diplomske naloge testirali le za namene prihodnjih presaditev.

6.6 REZULTATI PRESADITEV CELIC KM

6.6.1 Presaditev celic KM v skupini mladih miši BALB/c

Osnovni namen študije presaditve KM skupin mladih prejemnic (starosti 15 do 19 tednov) je bil ugotoviti, ali obstaja razlika v času po presaditvah oz. ali se bodo pokazale kakšne razlike v vsaditvi celic KM 1 in 3 mesece po presaditvi celic mladih darovalcev (starosti 7 do 9 tednov). Pri analizi DNA pridobljene iz KM in vranic prve skupine prejemnic (M A, M B in M C) s PCR-RČ en mesec po presaditvi himerizma nismo zaznali. Himerizma prav tako nismo zaznali v bazenu vzorcev periferne krvi (preglednici 6.6.1.1 in 6.6.1.3).

Ker v prvi skupini mladih prejemnic nismo zaznali himerizma (preglednica 6.6.1.1, M A, M B in M C), smo se lotili korigiranja postopkov presaditve celic pri drugi skupini mladih prejemnic (M 1, M 4 in M 5) in opravili številne teste, s katerimi smo želeli zmanjšati število neznank pri raziskavi.

Opravili smo dodatne preizkuse, da bi se prepričali, da izostanek himerizma ni morda posledica neuspešnih injekcij celične suspenzije v repno veno. Po Quesenberry in sod. (2005), Colvin in sod. (2007) in Ellis in sod. (2011) ostajajo celice v krvnem obtoku nekje do ene in največ šest ur po presaditvi v veno, zato smo prejemnicam z oznako M 1, M 3 in M 4 15 do 30 minut po presaditvi 30 milijonov celic iz repa odvzeli 70 μ l krvi in določili odstotek darovalčevih celic v periferni krvi. Rezultati so pokazali, da je v krvi prejemnic v tem času krožilo 66,1 % (M 1), 29,1 % (M 3) in <0,6 % (M 4) celic darovalca (preglednica 6.6.1.1). Pri tem se je pokazalo, da je zelo pomembno natančno injiciranje presadka v žilo, saj celice pri nenatančni injekciji sicer pridejo v podkožje namesto v krvni obtok (te obravnavamo kot nepresajene). Pri sami presaditvi smo zabeležili, da je bilo injiciranje pri prejemnici M 1 zelo uspešno, pri M 4 pa smo zabeležili, da je bila injekcija slabša (po občutku naj bi šlo v žilo le polovico odmerka). Prejemnici M 1, pri kateri smo spremljali visoko raven darovalčevih celic v periferni krvi, smo naslednji dan odvzeli vzorce KM in vranice, izolirali DNA in opravili PCR-RČ. V KM smo zaznali manj kot 0,8 % in v vranici manj kot 0,6 % moške DNA. Čeprav smo tej miši presadili do 120 milijonov celic (ker je bila to prva prejemnica pri našem poskusu, jih je verjetno prejela precej manj), pričakovanega himerizma (do 21 %) nismo zaznali.

Ko smo presadili s PKH26 obarvane celice samca pri prejemnici M 3, smo naslednji dan s PCR-RČ analizo zaznali zelo majhno količino moške DNA v KM in vranici prejemnice, ki se je ne da kvantificirati (verjetno manj kot 0,5 %). S pretočno citometrijo smo izmerili 1,9 % obarvanih celic v KM prejemnice, vendar je rezultat lahko višji ker pretočni citometer zazna tudi obarvane eritrocite, medtem ko PCR-RČ zazna le DNA (ki pa je v eritrocitih ni).

Če je moške DNA v vzorcu <0,5 %, je rezultat PCR-RČ težko ovrednotiti (to je odvisno od vsake posamezne analize). Z občutljivo metodo po An in Kang (2013) smo lahko zaznali 0,2 % moške DNA, ki se je pomnožila pri 31,5 Cq, kvantificirali pa smo jo lahko natančneje šele nad 0,5 %, saj je izračun po dobljeni premici standardne krivulje lahko vodil v lažno pozitivne ali negativne rezultate. Zaradi velike verjetnosti, da so rezultati z himerizmom manj kot 0,5 % lažno pozitivni, smo te rezultate obravnavali kot negativne,

izjema je bila analiza z dne 20. 08. 2014, ko smo z izračunom ugotovili lažno negativnost pri 0,2 % himerizmu.

Preglednica 6.6.1.1: Rezultat presaditve celic KM mladih darovalcev (starosti 7 do 9 tednov) pri šestih mladih prejemnicah BALB/c (starosti od 15 do 19 tednov na dan prve presaditve). V preglednici so podani rezultati dvakratne analize istih vzorcev.

Ozn. preje - mnic	Število presajenih celic KM (datum presaditve)	Čas po PKM	Vzorci	♂ DNA (%), 400nM ¹ ; 3.7.14	♂ DNA (%); 400 nM; 20.8.14
M A²	45 x 10 ⁶ (23.4.14)	32 dni	M A KM SPIR. ³	0,00	0,00
	45 x 10 ⁶ (24.4.14) ⁵	32 dni	M A KM TREN. ³	0,00	/
		32 dni	M A VRAN. SRED. ⁴	0,00	0,00
		32 dni	M A VRAN. ROB	0,00	/
M B	25 x 10 ⁶ (28.4.14)	27 dni	M B KM SPIR. ³	0,00	0,00
	15 x 10 ⁶ (29.4.14) ⁵	27 dni	M B KM TREN. ³	0,00	/
		27 dni	M B VRAN.	0,49	0,00
M C	6,2 x 10 ⁶ (28.4.14)	27 dni	M C KM SPIR. ³	0,00	0,00
	8,4 x 10 ⁶ (29.4.14) ⁵	27 dni	M C KM TREN. ³	0,00	/
		27 dni	M C VRAN.	0,00	0,00
M 1²	45 x 10 ⁶ (24.4.14)	60 dni + 15 min ¹⁰	M 1 KRI (15 MIN. PO 3. PKM)	66,07	66,95
	45 x 10 ⁶ (24.4.14) ⁵	60 dni + 1 dan	M 1 KM	0,83	0,00
	30 x 10 ⁶ (23.6.14)	60 dni + 1 dan	M 1 VRAN.	0,63	0,00
M 3	25 x 10 ⁶ (28.4.14)	55 dni + 8 dni +15 min.	M 3 KRI (15 MIN. PO 3. PKM)	21,89	29,09
	15 x 10 ⁶ (29.4.14) ⁵	55 dni + 8 dni +1 dan	M 3 KM	0,56	0,00
	30 x 10 ⁶ (23.6.14)	55 dni + 8 dni +1 dan	M 3 VRAN.	<2,5 ⁹	0,00
	12,3 x 10 ⁶ (1.7.14) ⁶				
M 4	9,4 x 10 ⁶ (28.4.14)	55 dni + 8 dni + 30 min	M 4 KRI (30 MIN. PO 3. PKM)	<0,6	/
	8,4 x 10 ⁶ (29.4.14) ⁵	55 dni + 8 dni + 1 dan	M 4 KM	0,00	0,00
	15-30 x 10 ⁶ (23.6.14)	55 dni + 8 dni + 1 dan	M 4 VRAN.	0,00	0,00
	16,4 x 10 ⁶ (1.7.14) ⁷				

¹ Na dan 3. 7. 2014 je bila PCR-RČ opravljena po protokolu: 10 minut na 95°C, 42 ciklov po 95°C za 10 sekund, 25 sekund po 58°C in 15 sekund po 72°C ter zaključek z disociacijsko krivuljo, na dan 20. 8. 2014 pa po protokolu: 10 minut na 95 °C , 45 ciklov po 95 °C za 15 sekund, 30 sekund po 58 °C in 30 sekund po 72 °C ter zaključek z disociacijsko krivuljo.

² Prejemnice so verjetno prejele manj celic, kot je zapisano.

³ Prejemnice M A, M B in M C so bile prve, ki smo jim analizirali KM. Želeli smo videti, ali bo rezultat himerizma drugačen, če bomo celice KM pridobili na drugačen način: a) celice KM sredic dolgih kosti smo pridobili s spiranjem (označeno »SPIR.«) in b) celice KM smo pridobili s trenjem prej spranih kosti (vključno z odrezanimi končnimi deli; označeno »TREN.«). Ker je bil rezultat negativen, smo vse nadaljnje izolacije celic KM opravili po standardnem postopku trenja.

⁴ Vranico smo razrezali ter celice izolirali iz robnega in sredinskega dela vranice.

⁵ Presadek celic KM je bil pred presaditvijo shranjen na 4 °C do največ 24 ur po izolaciji.

⁶ Celice smo označili z barvilom PKH26.

⁷ Celice izvirajo iz samice in označili smo jih z barvilom PKH26.

⁸ Rezultati vrednosti do 0,5 % so lahko lažno pozitivni.

⁹ Se ne da ovrednotiti, ker sta se pomnožila dva produkta.

¹⁰ 60 dni + 15 min pomeni, da smo analizirali organ prejemnice, ki je prejela prvo presaditev 60 dni in drugo presaditev 15 minut pred odvzemom vzorca.

Preglednica 6.6.1.2: Rezultat presaditve celic KM mladih darovalcev (starosti 7 do 9 tednov) pri starih prejemnicah BALB/c (starosti 15 mesecev na dan prve presaditve). V preglednici so podani rezultati dvakratne analize istih vzorcev.

Ozn. prejemnic	Število presajenih celic KM (datum presaditve)	Čas po PKM	Vzorci	♂ DNA (%); 200 nM; 14.8.14	♂ DNA (%); 400 nM; 20.8.14
M 10²	30 x 10 ⁶ (12.5.14)	42 dni + 24 dni	M 10 KM	0,42 ⁴	0,00
	30 x 10 ⁶ (23.6.14)		M 10 VRAN.	0,39	0,00
	30 x 10 ⁶ (16.7.14) [†]		M 10 PLJ.	7,53	8,07
			M 10 JET.	0,43	/
			M 10 LED.	0,49	/
			M 10 REP	3,13	2,53
M 11²	30 x 10 ⁶ (12.5.14)	42 dni + 24 dni	M 11 KM	0,42	0,00
	30 x 10 ⁶ (23.6.14)		M 11 VRAN.	0,00	0,00
	15 x 10 ⁶ (16.7.14) [†]		M 11 PLJ.	4,53	4,77
			M 11 JET.	0,44	/
			M 11 LED.	0,42	/
			M 11 REP	0,89	0,48
M 40²	30 x 10 ⁶ (12.5.14)	42 dni + 24 dni	M 40 KM	0,40	0,00
	30 x 10 ⁶ (23.6.14)		M 40 VRAN.	0,39	0,00
	30 x 10 ⁶ (16.7.14) [†]		M 40 PLJ.	3,82	4,84
			M 40 JET.	0,52	/
			M 40 LED.	0,40	/
			M 40 REP	1,51	1,51
M 13	30 x 10 ⁶ (12.5.14)	42 dni + 56 dni	MOUSE 13 KM	/	0,00
	30 x 10 ⁶ (23.6.14)		M 13 VRAN.	/	/
			M 13 PLJ.	/	/
			M 13 REP	/	/
M 30	30 x 10 ⁶ (12.5.14)	42 dni + 56 dni	M 30 KM	/	0,00
	30 x 10 ⁶ (23.6.14)		M 30 VRAN.	/	/
			M 30 PLJ.	/	/
			M 30 REP	/	/
M 14	30 x 10 ⁶ (12.5.14)	98 dni	M 14 KM	/	0,00
	20 x 10 ⁶ (13.5.14) ³		M 14 VRAN.	/	/
			M 14 PLJ.	/	/
			M 14 REP	/	/
M 31	30 x 10 ⁶ (12.5.14)	99 dni	M 31 KM	/	0,00
	20 x 10 ⁶ (13.5.14) ³		M 31 VRAN.	/	0,00
			M 31 PLJ.	/	0,00
			M 31 REP	/	0,00
M 33	30 x 10 ⁶ (12.5.14)	99 dni	M 33 KM	/	0,00
	20 x 10 ⁶ (13.5.14) ³		M 33 VRAN.	/	0,00
			M 33 PLJ.	/	0,00
			M 33 REP	/	0,00
M 0	30 x 10 ⁶ (12.5.14)	99 dni	M 0 KM	/	0,00
	20 x 10 ⁶ (13.5.14) ³		M 0 VRAN.	/	0,00
			M 0 PLJ.	/	0,00
			M 0 REP	/	0,00

¹ PCR-RČ je bil opravljen po protokolu: 10 minut na 95 °C, 45 ciklov po 95 °C za 15 sekund, 30 sekund po 58 °C in 30 sekund po 72 °C ter zaključek z disociacijsko krivuljo.

² Prejemnice so poginile v roku dveh minut po tretjem injiciranju celic.

³ Presadek celic KM je bil pred presaditvijo shranjen na 4 °C do največ 24 ur po izolaciji.

⁴ Rezultati vrednosti do 0,5 % so lahko lažno pozitivni.

Preglednica 6.6.1.3: Odstotek moške DNA v periferni krvi prejemnic po presaditvi celic KM. Prejemnicam smo vzeli vzorce periferne krvi (po 70 µl), jih združili v bazene ter iz bazenov krvi izolirali DNA. Vzorce smo morali združiti v bazene, ker bi posamezni vzorci vsebovali premajhno količino DNA za uspešno analizo.

Oznaka prejemnic	Število presajenih celic KM (datum presaditve)	Čas po PKM	Vzorci	♂ DNA (%), 400nM ¹ ; 3.7.14	♂ DNA (%); 400 nM; 20.8.14
1. SKUPINA STARIH MIŠI (M 10 + M 11 + M 13 + M 30 + M 40)	30 x 10 ⁶ (12.5.14)	36 dni	BAZEN X KRI	0,00	/
2. SKUPINA STARIH MIŠI (M 14 + M 31 + M 33 + M 0)	30 x 10 ⁶ (12.5.14)	36 dni	BAZEN Y KRI	0,00	0,00
	20 x 10 ⁶ (13.5.14)				
2. SKUPINA MLADIH MIŠI (M 1 + M 3 + M 4)	16-90 x 10 ⁶ (24.4.-29.4.14)	50-54 dni	BAZEN Z KRI	0,00	0,00

¹ Na dan 3. 7. 2014 je bila PCR-RČ opravljena po protokolu: 10 minut na 95°C, 42 ciklov po 95°C za 10 sekund, 25 sekund po 58°C in 15 sekund po 72°C ter zaključek z disociacijsko krivuljo, na dan 20. 8. 2014 pa po protokolu: 10 minut na 95 °C , 45 ciklov po 95 °C za 15 sekund, 30 sekund po 58 °C in 30 sekund po 72 °C ter zaključek z disociacijsko krivuljo.

6.6.2 Presaditev KM v skupini starih prejemnic BALB/c

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti ali serijska (zaporedna) presaditev celic KM vodi v večjo vsaditev celic pri skupini starih prejemnic miši BALB/c (starosti 15 mesecev). Naši rezultati presaditve celic KM so bili negativni, himerizma torej nismo zaznali (preglednica 6.6.1.2), zato primerjava uspešnosti zaporednih presaditev ni bila možna.

Pri vseh starih prejemnicah smo himerizem preverjali v KM, vranici, pljučih in kožnem delu repa (pri nekaterih še v jetrih in ledvicah). Himerizma nismo zaznali pri nobenem osebku, izjema so bile tri prejemnice (M 10, M 11 in M 40), ki so poginile nekaj minut po tretji injekciji celičnega presadka (preglednica 6.6.2.1). Pri njih smo celice darovalca zaznali v kožnem delu repa (do 2,5 %), nad mestom injekcije celic v repno veno (mesto, kjer je bila presaditev le delno uspešna) in v pljučih (2,5 % do 8 % himerizem).

Ko smo preverjali himerizem v periferni krvi starih prejemnic, pet tednov po presaditvi, tudi v tem primeru z analizo s PCR-RČ nismo zaznali prisotnosti darovalčevih celic (preglednica 6.6.1.3). Ker smo vsaki miši lahko odvzeli le okoli 70 µl periferne krvi, smo vzorce prejemnic združili in določali himerizem mešanic (bazen X je združeval periferno kri miši M 10, M 11, M 13, M 30 in M 40, bazen Y pa je združeval periferno kri miši M 14, M 31, M 33 in M 0). Rezultat je bil prav tako negativen.

6.6.3 Rezultati izolacije DNA

Koncentracijo pridobljene DNA in njeno čistost smo preverili s spektrofotometrom NanoDrop. Razmerje A260/A280 nad 1.8 je splošno sprejeto kot »čista« DNA in tudi naši vzorci so pokazali zeleno čistost (preglednica 6.6.3.1). Malce manj čisti so bili le vzorci, kjer je bila prisotna nižja količina DNA, a še zmeraj dovolj čisti za nadaljnjo analizo; najmanj čisti so bili vzorci repa.

Vrednosti A260/A230, ki štejejo za »čisto« nukleinsko kislino so običajno v razponu 2–2,2. Pri naših vzorcih pogosto nismo dobili te želene vrednosti, vendar pa so rezultati PCR-RČ pokazali, da je bila pridobljena DNA dovolj čista za analizo (izjema so bili le vzorci repa).

Preglednica 6.6.3.1: Rezultati izolacije DNA v vzorcih

Vzorec	V DNA (ul)	c DNA (ng/ul)	celokupna DNA (ng)	A260/A280	A260/A230
Kri samice (za umer.)	50	81,8	4090	1,85	1,52
Kri samice 2 (za umer.)	50	90,1	4505	1,9	1,33
Kri samca (za umer.)	50	88,4	4420	1,88	1,59
M A KM SPIR.	50	142,1	7105	1,81	1,92
M A KM TREN.	50	140,0	7000	1,81	1,56
M A VRAN. SRED.	50	125,7	6285	1,84	2,12
M A VRAN. ROB	50	263	13150	1,9	2,23
M B KM SRED.	50	158,3	7915	1,81	1,94
M B KM TREN.	50	166,6	8330	1,81	1,42
M B VRAN.	50	92,9	4645	1,87	2,14
M C KM SPIR.	50	150,6	7530	1,82	1,69
M C KM TREN.	50	146,4	7320	1,81	2,03
M C VRANICA	50	334,2	16710	1,9	2,26
M 1 KRI	50	15,0	750	1,68	0,49
M 1 KM	50	80,0	4000	?	1,5
M 1 VRAN.	50	128	6400	-	-
M 3 KRI	50	50,0	2500	1,68	0,48
M 3 KM	50	71,4	3570	-	-
M 3 VRAN.	50	48,1	2405	-	-
M 4 MIS	50	15,0	750	1,68	0,49
M 4 KM	50	65,1	3255	-	-
M 4 VRAN.	50	160,3	8015	-	-
BAZEN X	50	128,5	6425	1,89	1,81
BAZEN Y	50	82,6	4130	1,88	1,13
BAZEN Z	50	97,4	4870	1,79	1,9
M 10 KM	50	71,6	3580	1,93	1,74
M 10 REP	50	8,63	431,50	1,49	2,33
M 10 LED.	50	244,5	12225,00	2,00	2,43
M 10 JET.	50	180,6	9030,00	1,9	1,48
M 10 PLJ.	50	34,4	1720,00	1,9	2,44
M 10 VRAN.	50	296,1	14805,00	1,89	2,29
M 11 KM	50	58,5	2925	1,94	1,82
M 11 REP	50	10,86	543,00	1,75	2,41
M 11 LED.	50	397,9	19895,00	1,91	2,07
M 11 JET.	50	382,3	19115,00	1,92	2,25
M 11 PLJ.	50	104,64	5232,00	1,73	1,02
M 11 VRAN.	50	58,8	2940,00	1,97	1,47
M 40 KM	50	62,7	3135	1,92	1,63
M 40 REP	50	12,3	615,00	1,53	0,99
M 40 LED.	50	327,2	16360,00	1,98	2,3
M 40 JET.	50	330	16500,00	1,93	1,9

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 6.6.3.1: Rezultati izolacije DNA v vzorcih

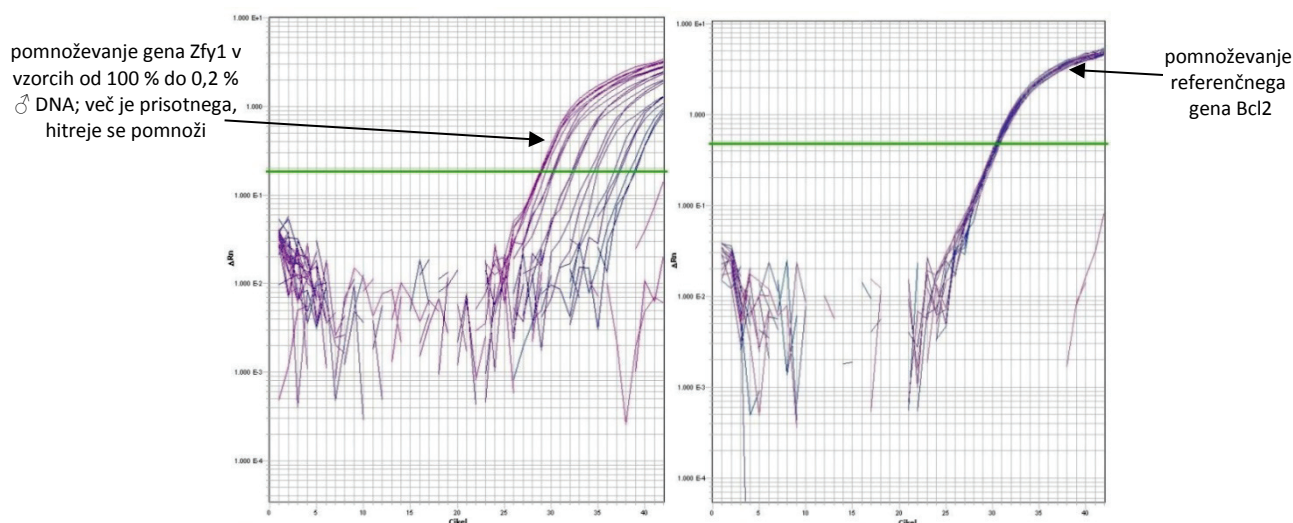
M 40 PLJ.	50	44,8	2240,00	1,87	2,06
M 40 VRAN.	50	419,1	20955,00	1,88	2,33
M 13 KM	50	60,1	3005,00	1,86	1,74
M 14 KM	50	69,3	3465,00	1,81	1,8
M 30 KM	50	44,1	2205,00	1,86	1,61
M 31 KM	50	46,9	2345,00	1,89	1,68
M 31 VRAN.	50	93,3	4665,00	1,86	1,51
M 31 PLJ.	50	29,3	1465,00	2,32	0,94
M 31 REP	50	5,5	275,00	6,9	0,22
M 33 KM	50	91,0	4550,00	1,82	1,84
M 33 VRAN.	50	44,9	2245,00	2,08	0,81
M 33 PLJ.	50	66,6	3330,00	2,01	1,29
M 33 REP	50	6,3	315,00	4,10	0,33
M 0 KM	50	62,1	3105,00	1,9	1,74
M 0 VRAN.	50	129,5	6475,00	1,97	1,7
M 0 PLJ.	50	48,9	2445,00	2,07	1,24
M 0 REP	50	23,4	1170,00	2,15	0,83

6.6.4 Rezultati analize s PCR v realnem času

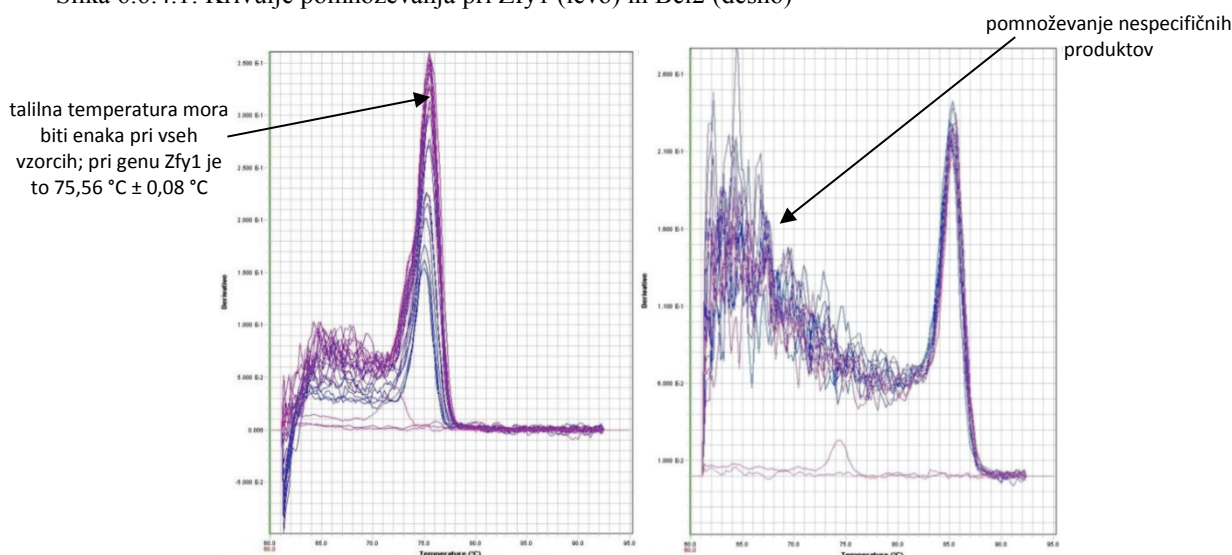
Za določitev odstotka moške DNA v vzorcih prejemnic po presaditvi smo izbrali metodo PCR-RČ na osnovi postopka, ki ga priporočata An in Kang (2013). Sprva smo natančno sledili njunim navodilom, le da smo pri tem uporabili material drugih proizvajalcev. PCR-RČ smo opravili na plošči s 96 vdolbinicami in inštrumentu za PCR ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System.

Metodo smo preizkusili tako, da smo pripravili umeritveno krivuljo. Izolirano DNA, pridobljeno iz celic krvi samca in samice BALB/c, smo razredčili na 4 ng/μl ter ju zmešali v razmerjih, tako da smo dobili 0,2%, 0,5%, 2,5%, 12,5%, 50%, 87,5% in 100% moške DNA. Vzorce DNA smo porazdelili v vdolbinice v triplikatih (Zfy1) in duplikatih (Bcl2) ter dodali mešanico SYBR Green Master Mix, par začetnih oligonukleotidov, ZO (400 nM) ter vodo. Ploščo smo vstavili v inštrument za PCR z nastavitvami: 95°C za 10 minut, 42 ciklov s 95°C za 10 sekund, 58°C za 25 sekund in 72°C za 15 sekund ter zaključek z disociacijsko krivuljo.

Gen Bcl2 služi kot referenčni gen in njegove krivulje se morajo praktično prekrivati, kar nakazuje, da smo v vsako vdolbinico vnesli enako količino DNA. Sliki 6.6.4.1 in 6.6.4.2 na desni prikazujeta omenjeno prekrivanje pri pomnoževanju Bcl2, na levi pa sliki prikazujeta različne krivulje pomnoževanja gena Zfy1, ki je v različnih vzorcih prisoten v različnih količinah. Kljub temu, da je prisoten v različnih količinah pa se mora disociirati pri vseh vzorcih pri enaki temperaturi. Čeprav so se pri Bcl2 krivulje prekrivale, pa smo z nadaljnjimi izboljšavami želeli odpraviti pomnoževanje drugih nespecifičnih produktov (vidni kot še en nakazan vrh spredaj na sliki 6.6.4.2, desno).



Slika 6.6.4.1: Krivulje pomnoževanja pri Zfy1 (levo) in Bcl2 (desno)

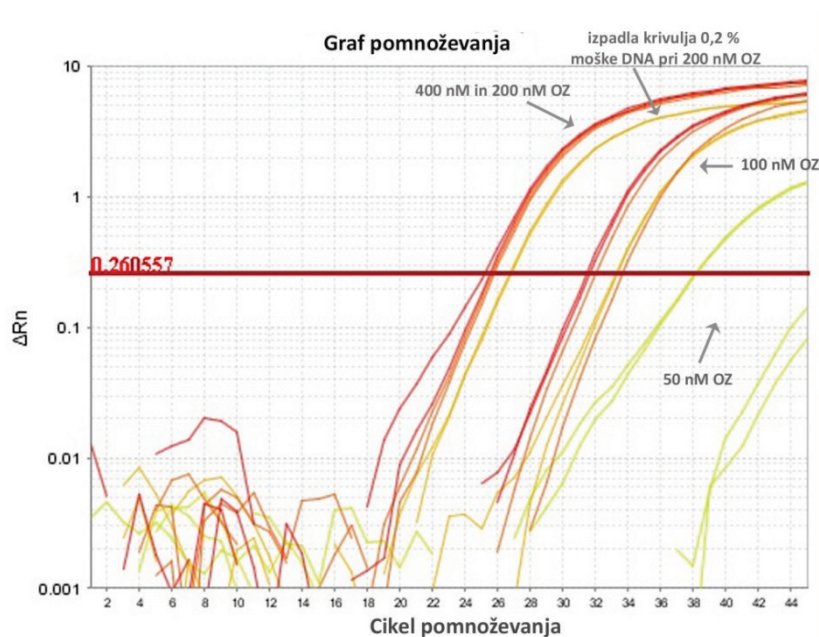


Slika 6.6.4.2: Disociacijske krivulje pri Zfy1 (levo) in Bcl2 (desno)

Uporaba plošče s 384 vdolbinicami, sprememba protokola ciklov in optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov

Po optimizaciji postopka PCR-RČ smo prešli iz plošče z 96 vdolbinicami na plošče s 384 vdolbinicami. Volumen v posamezni vdolbinici se je tako razpolovil na 10 μl ter s tem tudi poraba reagentov. Zamenjali smo tudi inštrument za PCR in prešli na ViiaTM 7 podjetja Life technologies.

Pri protokolu 10 minut na 95 $^{\circ}\text{C}$, 45 ciklov po 95 $^{\circ}\text{C}$ za 15 sekund, 30 sekund po 58 $^{\circ}\text{C}$ in 30 sekund po 72 $^{\circ}\text{C}$ ter zaključek z disociacijsko krivuljo smo preizkusili delovanje ZO na vzorcih 0,2% in 12,5% moške DNA v različnih koncentracijah: 400 nM, 200 nM, 100 nM in 50 nM. Rezultat je pokazal, da je najboljša uporaba 400 nM ZO (slika 6.6.4.3).



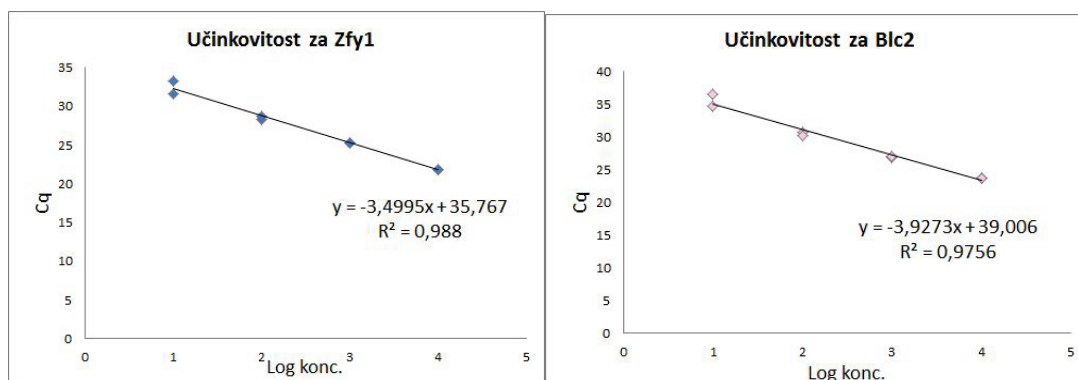
Slika 6.6.4.3: Krivulje pomnoževanja pri testu različnih koncentracij ZO. Pri uporabi 400 nM in 200 nM so rezultati zelo podobni, le pri vzorcu z 0,2 % moške DNA se je produkt pomnožil malce kasneje.

Nekatere vzorce smo testirali z uporabo 400 nM in 200 nM. V obeh primerih so se produkti moške DNA lepo pomnožili, če so le bili prisotni (več kot 1 %), to je bilo pri vzorcih pljuč in repa pri skupini starih prejemnic (preglednica 6.6.1.2).

Za obe količini ZO smo določili tudi naklon (S , angl. *slope*) in učinkovitost (E , angl. *efficiency*) pri razredčenih vzorcih 100 % moške DNA: pri 200 nM in 400 nM koncentraciji ZO smo vzorce redčili 10x, 100x, 1000x in 10000x (8,5 ng/μl do 8,5 pg/μl). Naklon premice smo izračunali iz dobljenih C_q vrednosti pri različnih logaritmiranih redčitvah DNA (slika 6.6.4.4) ter nato izračunali učinkovitost (preglednica 6.6.4.1) po formuli 5.11.3.2.1: $E = (10^{-1/s} - 1)$. Učinkovitost 400 nM ZO je v okviru splošnih priporočil med 0,9 in 1,1 (oz. med 90 % in 110 %; Life technologies, 2012), vendar je sprejemljiva tudi učinkovitost 200 nM ZO, ki je v območju med 0,8 in 1,2 (Baebler in sod., 2011).

Preglednica 6.6.4.1: Naklon (S) in učinkovitost (E) PCR-RČ

Uporabljeni ZO	Naklon (S)	Učinkovitost (E)
200 nM Zfy1	-3,64	0,88
200 nM Bcl2	-3,72	0,86
400 nM Zfy1	-3,5	0,93
400 nM Bcl2	-3,38	0,98

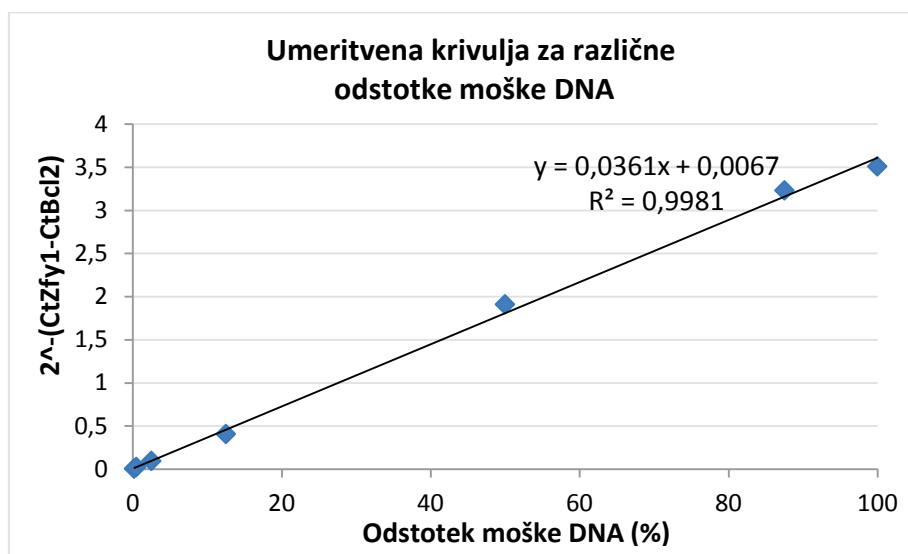


Slika 6.6.4.4: Rezultati testa učinkovitosti za Zfy1 in Bcl2. Učinkovitost pri 400 nM za Zfy1 je 0,93, učinkovitost za Bcl2 je 0,98.

Končni postopek PCR-RČ za določanje himerizma

Za določanje količine moške DNA v vzorcih je najboljši postopek s 400 nM začetnimi oligonukleotidi Zfy1 in Bcl2 na plošči z 384 vdolbinicami in napravi ViiaTM 7 podjetja Life technologies. Pri tem smo uporabili časovni okvir ciklov: 10 minut na 95 °C, 45 ciklov po 95 °C za 15 sekund, 30 sekund po 58 °C in 30 sekund po 72 °C ter zaključek z disociacijsko krivuljo. Po tem postopku smo določali himerizem v vseh zbranih vzorcih KM, krvi, vranice, pljuč, jeter, ledvic in kožnega dela repa.

Iz rezultatov znanih vrednosti odstotkov moške DNA smo po formuli An in Kang (2013) postavili umeritveno krivuljo in ji določili trendno črto (slika 6.6.4.5), pri čemer smo uporabili formuli $\Delta Cq(Cq^{Zfy1} - Cq^{Bcl2})$ in $2^{-\Delta Cq}$ (5.11.3.1.1 in 5.11.3.1.2). Formulo dobljene premice smo uporabili za izračun neznanih vrednosti moške DNA v vzorcih (rezultati so navedeni v preglednicah 6.6.1.1, 6.6.1.2 in 6.6.1.3). Preverili smo tudi talilno temperaturo vseh disociacijskih krivulj (slika 6.6.4.6), s čimer smo se prepričali, da se pomnožuje pravo nukleotidno zaporedje. Povprečna temperatura disociacije pri vzorcih umeritvene krivulje je bila pri Zfy1 $75,56\text{ °C} \pm 0,08\text{ °C}$ in pri Bcl2 $85,63\text{ °C} \pm 0,08\text{ °C}$.



Slika 6.6.4.5: Umeritvena krivulja znanih vrednosti odstotkov moške DNA.

Med rezultati smo za natančen izračun himerizma pri vzorcih z neznano količino moške DNA upoštevali le tiste, pri katerih je imela disociacijska krivulja le en vrh in talilno temperaturo pri Zfy1 $75,42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,17\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter pri Bcl2 $85,49\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,15\text{ }^{\circ}\text{C}$. V nekaterih primerih natančen izračun zaradi dveh vrhov (pomnožil še je še en nespecifičen produkt) ni bil mogoč, zato smo vrednost moške DNA le ocenili (na primer, $<0,2\text{ }%$).

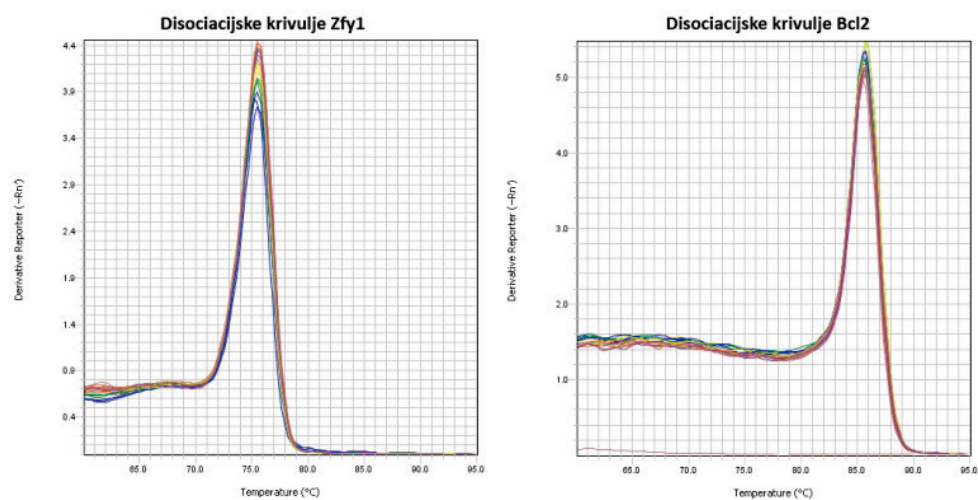
Pri izračunu smo upoštevali prag detekcije, ki ga je avtomatsko postavil program ViiaTM 7. Grafa pomnoževanja na sliki 6.6.4.7 prikazujeta krivulje pomnoževanja produktov glede na količino prisotnosti moške DNA pri Zfy1 in glede na količino prisotnosti DNA pri Bcl2. Pri Bcl2 se je nekaj krivulj pomnožilo kasneje, kar nakazuje, da meritev koncentracije DNA z NanoDropom pri nižjih koncentracijah ni tako natančna ter da je normalizacija z referenčnim genom zaželen.

Pri disociacijskih krivuljah vzorcev z Zfy1 vidimo (slika 6.6.4.8, levo), da so se v primeru pomanjkanja moške DNA pomnoževala druga nukleotidna zaporedja. Do tovrstnega pomnoževanja običajno prihaja, ko ni prisotnega tarčnega nukleotidnega zaporedja ali pa je prisoten v zelo majhnih količinah.

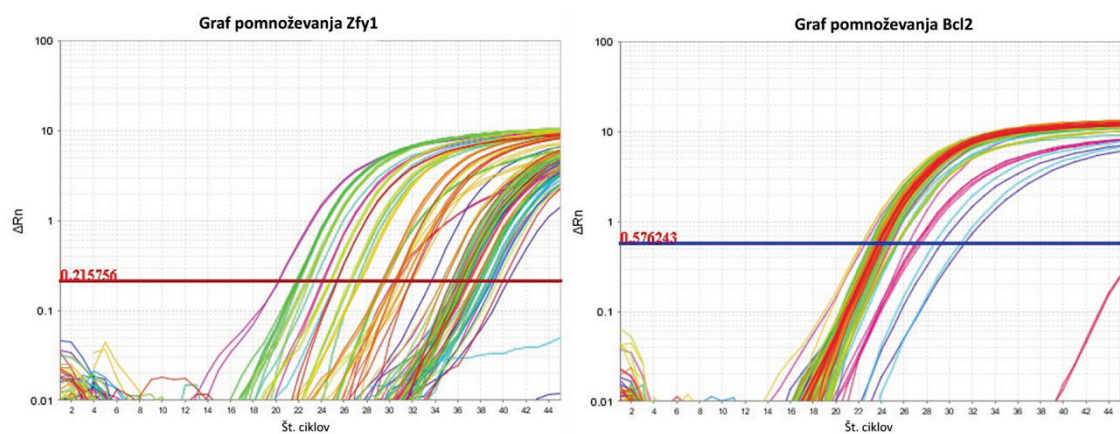
Ko je v vzorcu moške DNA zelo malo (do $1\text{ }%$), je zaradi že omenjenega pomnoževanja drugih nukleotidnih zaporedij težko natančno kvantificirati odstotek moške DNA. Poleg tega pa je na občutljivost metode vplivala sama pridobljena formula umeritvene krivulje, ki je lahko vodila do $0,5\text{ }%$ lažno pozitivnega ali lažno negativnega rezultata. Dobljeno formulo smo tako vedno preverili na znanih vzorcih (preglednica 6.6.4.2) in s tem dobili boljši vtis o tem, kako občutljiva je metoda.

Preglednica 6.6.4.2: Primer izračuna vrednosti za postavitev umeritvene krivulje in test dobljene formule za izračun znanih vrednosti moške DNA v vzorcih (PCR-RČ z dne 20. 08. 2014)

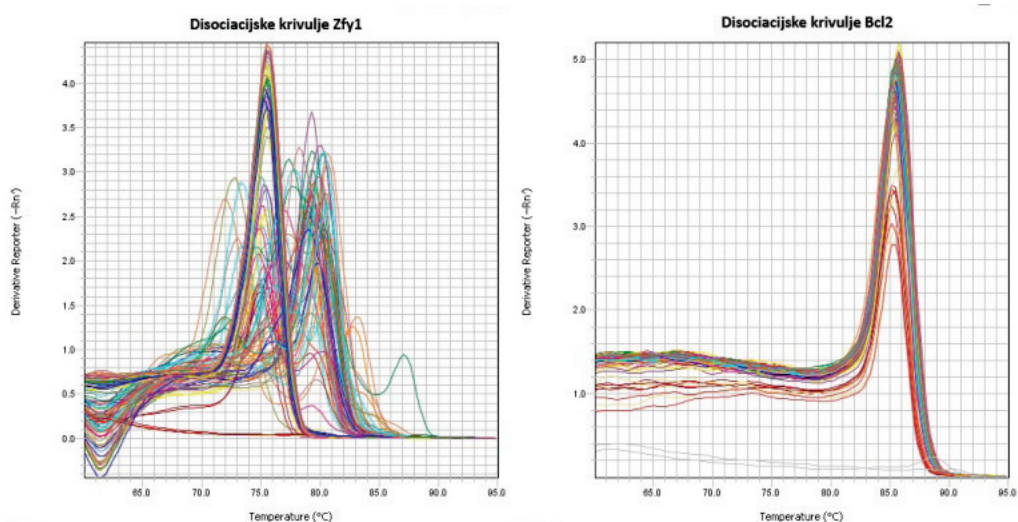
Odstotek moške DNA v vzorcu (%)	Cq Zfy1	Cq Bcl2	$2^{-(Cq^{Zfy1} - Cq^{Bcl2})}$	Testni izračun odstotka moške DNA v vzorcu po dobljeni formuli umeritvene krivulje $y = 0,0361x + 0,0067\text{ }%$
0,2	31,498	23,677	0,004421393	-0,06
0,5	29,548	24,08	0,022600066	0,44
2,5	27,478	24,068	0,094037145	2,42
12,5	24,847	23,552	0,407650924	11,1
50	22,811	23,743	1,907933186	52,7
87,5	21,929	23,621	3,232037299	89,3
100	21,967	23,777	3,508202166	96,7



Slika 6.6.4.6: Disociacijske krivulje za Zfy1 in Bcl2. Povprečna talilna temperatura vzorcev umeritvene krivulje je bila pri Zfy1 $75,56^{\circ}\text{C} \pm 0,08^{\circ}\text{C}$ in pri Bcl2 $85,63^{\circ}\text{C} \pm 0,08^{\circ}\text{C}$.



Slika 6.6.4.7: Grafa pomnoževanja vseh vzorcev pri PCR-RČ z dne 20. 08. 2014.



Slika 6.6.4.8: Disociacijske krivulje za Zfy1 in Bcl2 za vse vzorce z dne 20. 08. 2014.

Določitev števila celic za pozitiven rezultat

Zanimalo nas je, kolikšno je najmanjše število celic moškega spola v vzorcu KM ali periferne krvi, da pri PCR-RČ lahko moško DNA zaznamo in jo kvantificiramo. Iz podatka po dos Anjos Pires s sod. (2001), da je v eni celici vranice 6.42 ± 0.234 pg DNA, smo izračunali, da potrebujemo v vzorcu 0,2 % moške DNA 7 celic z jedrom – to je dovolj da moško DNA le zaznamo. Za to da moško DNA lahko kvantificiramo – da dosežemo vsaj 0,5 % (morda 1 %) himerizem – potrebujemo v vzorcu vsaj 9 (morda do 17) celic darovalca.

7 RAZPRAVA IN SKLEPI

7.1 RAZPRAVA

Pričujoče diplomsko delo je pravzaprav pilotski poskus za večjo raziskavo, namenjeno preučevanju presaditve KM pri neobsevanih starih miših BALB/c. Ker je za uspešno presaditev KM potrebno pripraviti dober presadek, ki vsebuje dovolj veliko število viabilnih celic, med katerimi so tudi KMC, je bil prvi cilj pripraviti takšen kakovosten presadek ter optimizirati postopke za njegovo pripravo.

Najboljši postopek za izolacijo celic KM je trenje

Presaditev KM na miših izvajajo že šest desetletij in večinoma so za pridobitev celic KM uporabili postopek spiranja kosti (predvsem stegenice, golenice in nadlahtnice). Šele v zadnjem desetletju se uveljavlja postopek trenja kosti, katerega prednost je večje število izoliranih celic in večji odstotek matičnih in progenitorskih celic (Colvin in sod., 2004). Nekateri izvajajo tudi postopke, ki vključujejo uporabo encimov kolagenaze in dispaze za razgradnjo kosti. V okviru naše raziskave smo preizkusili vse omenjene postopke izolacije celic iz kosti, ki smo jih izpeljali na podlagi priporočenih protokolov različnih avtorjev, med njimi Ramkumar in sod. (2013), Lo Celso in Scadden (2007), McGarry (2014), Madaan (2014), Benton (2009) ter Duran-Struuck in Dysko (2009).

Ugotovili smo, da je za izolacijo celic KM najprimernejši postopek trenja, saj smo z njim pridobili največje število celic, in sicer do 400 milijonov, kar je pričakovano število celic glede na predhodne rezultate, pridobljene pri miših BALB/c (Colvin in sod., 2004). Če uporabimo postopek trenja, lahko pri eni miši uporabimo več kosti kot pri spiranju, saj dodatno tremo še hrbtenico in črevnici, poleg tega je tudi sam postopek hitrejši. Ker so po trenju v celični suspenziji prisotni tudi strti delci kosti in maščobe, je zelo pomembno pridobljeno suspenzijo dobro prefiltrirati skozi 40 µm-najlonska sita in tik pred prenosom v brizgo še skozi 30 µm- najlonsko sito, ki omogoča filtriranje majhnih volumnov z veliko gostoto celic. Da je postopek trenja najprimernejši, dokazuje tudi objava Haylocka in sod. (2007), kjer navajajo, da s trenjem pridobimo večji odstotek progenitorskih celic, ki so v regijah endosta.

Kot dodaten poskus pri izolaciji celic smo uporabili tudi encima kolagenazo in dispazo ter spremljali, ali bomo z razgradnjo ostankov kosti po trenju izolirali še dodatno število celic. Na ta način smo izolirali le dodatnih 7 milijonov celic in celična suspenzija je vsebovala veliko kostnih delcev, zato se za nadaljevanje, ki bi vključevalo postopek encimske razgradnje, nismo odločili.

Celice, pridobljene s postopkom spiranja, so bile pričakovane morfolologije, suspenzija pa je vsebovala malo celičnega debrija, vendar pa smo s tem postopkom lahko izolirali le do 90 milijonov celic iz posameznih živali, kar je sicer v skladu s pričakovanim (izračunano po rezultatih Colvina in sod., 2004), a še vedno do štirikrat manj kot pri postopku trenja kosti.

Analiza sestave celičnih suspenzij s pretočnim citometrom po spiranju in trenju ni pokazala večjih razlik. V postavljenih vratih R1 smo se omejili na populacijo jedrnih celic, ki jih je bilo 50,5 % pri trenju in 67,2 % pri spiranju, njihova viabilnost pa v obeh primerih več kot 90 %. Pretočni citometer je pokazal, kar smo videli že z mikroskopom, da ima suspenzija, pridobljena s trenjem, več celičnega debrija.

Pri postopkih izolacije celic je dobro čim bolj omejiti centrifugiranje s spiranjem, saj pri tem vsakokrat izgubimo 25 % celic.

Najbolje je presaditi sveže izolirane celice KM

Naslednji korak pri določanju postopka presaditve KM je bil povezan s pripravo celične suspenzije za presaditev. Ugotovili smo, da je izolirano celično suspenzijo najboljše presaditi svežo, takoj po izolaciji. Z zmrzovanjem in odmrzovanjem celic izgubimo izredno veliko število celic (več kot 50 %). Ko smo celice nekaj dni spremljali na 4 °C in na sobni temperaturi, so visoko viabilnost ohranjale dolgo časa (>90 % po enem dnevu, do 67 % devet dni po izolaciji), a pri tem ne moremo trditi, da ta viabilnost velja tudi za krvotvorne matične in progenitorske celice, ki so ključne za uspešno vsaditev. Zanimivo je bilo, da je ponekod število živih celic sprva naraslo in šele zatem upadlo. Ta pojav občasno opažajo tudi pri KMC pri človeku (CD34+) pri odmrznjeni popkovnični krvi (Ifko, 2011, Laroche in sod., 2005).

Himerizem smo določali z metodo PCR v realnem času

Za določanje himerizma v prejemnicah je potrebno uporabiti celice darovalca, ki jih lahko razlikujemo od celic prejemnika. Celice darovalca bi lahko obarvali s fluorescenčnimi barvili, med katerimi je najprimernejši PKH26, ki se *in vivo* na matičnih celicah ohrani do 49 dni (Ude in sod., 2012). Obarvane celice bi nato spremljali s pretočnim citometrom. Ker je naš poskus potekal 90 dni in ker obstaja možnost, da bi PKH26 lahko prehajal tudi na druga tkiva (Li in sod., 2013), smo se odločili uporabiti raje celice moškega darovalca in himerizem določiti na podlagi kvantifikacije prisotnosti Y-kromosoma v prejemnicah ženskega spola.

Prisotnost Y-kromosoma v DNA smo določali s PCR-RČ po An in Kang (2013), ki smo jo optimizirali. Občutljivost metode je 0,2 %, zmožnost kvantifikacije pa je odvisna od vsake posamezne PCR-RČ – giblje se nekje med 0,5 % in 1 %. V območju do 0,5 % (oz. do 1 %) je moško DNA težko kvantificirati, saj lahko sama pridobljena formula premice umeritvene krivulje vodi do 0,5 % lažno pozitivnega ali lažno negativnega rezultata. Dobljeno formulo smo tako vedno preverili na znanih vzorcih iz umeritvene krivulje in s tem dobili boljši vtis o tem, od kje dalje je možna kvantifikacija. Da bi bil lažno pozitivni ali lažno negativni rezultati čim manjši, An in Kang (2013) priporočata, a) da na isti plošči analiziramo umeritveno krivuljo in neznane vzorce, kar smo že počeli, ter b) da točke umeritvene krivulje postavimo v območje, kjer pričakujemo rezultate. Morda bi pri prihodnjih PCR-RČ analizah naredili umeritveno krivuljo v območju od 0,2 % do 40 %.

Presaditev celic KM v neobsevane miši BALB/c je bila neuspešna – ni vodila v zaznavni himerizem

Po pripravi celičnega presadka smo presadili celice KM šestim mladim in devetim starim miši BALB/c. Prejemnice so bile ženskega spola in so prejele celice KM moških mladih darovalcev istega seva. Osnovni namen skupine z mladimi prejemnicami je bil spremljati razliko po enem ali po treh mesecih po presaditvi, vendar se je izkazalo, da himerizma v prvi skupini ni bilo, zato smo drugo skupino mladih prejemnic namenili kontroli in izboljšanju postopkov presaditve celic KM.

Celični presadek smo vbrizgali v eno od repnih ven prejemnic, vendar je bilo injiciranje celične suspenzije v žilo le deloma uspešno, saj je težave povzročala velika gostota celic v pripravku (do 45 milijonov celic v 110 do 200 μ l). Zaradi negotovosti, ali celice uspešno pridejo v krvni obtok, smo se odločili opraviti dodatne teste, ki bi nam odgovorili na to vprašanje. Trem mladim prejemnicam smo odvzeli vzorec periferne krvi 15 do 30 minut po presaditvi celic KM ter s PCR-RČ določili količino prisotne DNA darovalca. V krvi smo zaznali 66,9 %, 29 % in <0,6 %, kar sovпада z našimi opažanji pri sami injekciji celic, kjer smo zabeležili, da smo presaditev opravili dobro ali pa slabo. Kljub dobri injekciji celic KM pri prejemnici, ki jih je imela v krvi takoj po presaditvi 66,9 %, pa smo naslednji dan pri njej v KM zaznali le <0,8 % in v vranici <0,6 % darovalčeve DNA.

Izbrana metoda PCR-RČ je zelo občutljiva metoda za določanje moške DNA v vzorcih, vendar smo kljub temu želeli preveriti uspešnost presaditve še z barvanjem celic. Pred presaditvijo smo jih obarvali s fluorescenčnim barvilom PKH26, pri presaditvi pa smo uporabili celice darovalca ženskega in moškega spola. Pri barvanju nam je uspelo obarvati le 60 % presajenih celic, od katerih je pretočni citometer v KM prejemnice zaznal 1,9 %. Da smo v tem primeru zaznali večji himerizem je lahko razlog v tem, da smo s PKH26 obarvali tudi eritrocite, teh pa PCR-RČ ne zazna, saj ne vsebujejo DNA. Če bi želeli nadaljevati raziskave z barvanjem, bi morali metodo optimizirati, a se za to nismo odločili.

Pri presaditvah KM starim neobsevanim prejemnicam smo prav tako prišli do zaključka, da po presaditvah ni zaznavnega himerizma oz. se rezultati lahko gibljejo v območju do 0,5 %, ki se ga ne da natančno kvantificirati (v tem območju so rezultati lahko lažno pozitivni ali lažno negativni). Pri skupini starih prejemnic poskus ni potekal po želenem načrtu, saj so tri prejemnice poginile nekaj minut po injekciji celic ob tretji presaditvi. Poginulim prejemnicam smo odvzeli vzorce KM, vranice, pljuč, jeter, ledvic in kožnega dela repa, nad mestom injekcije, ter celice zaznali v repu (0,5 % do 2,5 % moške DNA) in pljučih (4,7 % do 8 % moške DNA). Rezultati kažejo, da a) vseh celic nismo uspeli injicirati v repno žilo, temveč, da jih je del prešel v podkožje, ter b) da so pljuča prvo mesto, kjer so se ustavile celice po injekciji.

Cui in sod. (1999) so spremljali, v katerih organih se ugnezdiijo celice 4 ure po presaditvi, in ugotovili, da so med njimi KM, vranica, jetra, pljuča, mišice, ledvice in srce. Medtem ko je bilo pri neobsevanih prejemnicah celic več v KM kot drugih organih, pa je bilo pri obsevanih prejemnicah celic največ v pljučih. Cui in sod. ne vidijo specifičnega vzorca pri migraciji presajenih celic ter predvidevajo, da gre za nespecifično prijemanje in da se le celice, ki preidejo v KM, srečajo s pravim okoljem, ki jih vodi v ugnezditve. Naši rezultati

kažejo prisotnost darovalčevih celic nekaj minut po presaditvi v pljučih, medtem ko jih v KM, jetrih, ledvicah in vranici ni bilo. Iz tega lahko sklepamo, da so pljuča prvi organ, kjer se ustavijo celice, preden se pridejo do drugih organov, morda zaradi preprostega toka krvi, ki jih iz venoznega dela skozi srce vodi do pljuč. Podatka o razporeditvi celic darovalca po telesu prejemnika tako hitro po presaditvi v objavah avtorjev še nismo opazili.

Po Brecher in sod. (1982), Saxe in sod. (1984), Rao in sod. (1997), Bubnic in Keating (2002) in Colvin in sod. (2004) presaditve celic KM vodijo v himerizem, ki je linearno odvisen od količine presajenih celic, in sicer v območju od 0,17 do 0,27 %, ali celo 0,52 %, na milijon presajenih celic KM. Odstotek končnega himerizma pri prejemnicah v odvisnosti od presajenega števila celic narašča vse do okoli 40 %, kjer naj bi dosegel plato (Blomberg in sod., 1998), čeprav lahko himerizem pri posameznih osebkih doseže tudi od 19 % do 88 % (po presaditvi 800 milijonov celic). Po teh rezultatih bi morali pri našem poskusu pri presaditvi 50 milijonov celic pri eni skupini starih prejemnic zaznati od 8,5 % do 13,5 % (ali celo do 26 %) himerizem. Glede na druge avtorje pa bi lahko pričakovali tudi nižji himerizem (ali celo odsotnost himerizma), saj so dosegli nižjo vsaditev, med njimi, na primer, Stewart in sod. (1993), ki so pri presaditvi 200 milijonov celic dosegli 10–18 % himerizem, pri presaditvi 30–40 milijonov celic pri BALB/c pa himerizma niso zaznali.

Zagotoviti je potrebno uspešno injekcijo celic v krvni obtok

Razlogov, zakaj v nekaterih prejemnicah nismo zaznali himerizma, je lahko precej. Sprva smo se lotili preverjanja izolacije celic KM in same presaditve. Ker smo imeli težave z gostoto celic v majhnem volumnu medija, smo opravili test z nekaj različnih medijev ter ugotovili, da je po dodatku heparina v medij za izolacijo celic celična suspenzija postala gosta in lepljiva, kar bi lahko bil vzrok za težave pri presaditvi. V medij smo v osnovi dodali heparin po predlogu Ramshawa in sod. (1995b) in Kovina in sod. (2013), saj naj bi ta zmanjšal smrtnost prejemnic in povečal vsaditev celic. V bodoče heparina v medij ne bomo dodajali, morda bi prejemnicam vbrizgali heparin ločeno na dan presaditve ali celo en dan prej. Iz medija bomo izločili tudi FBS, saj bi lahko v prejemnicah sprožal neželene imunske odzive ter zmanjšal možnost uspešne vsaditve.

Da bi zmanjšali gostoto celic v presadku, smo opravili tudi lizo eritrocitov in pripravili presadek, ki vsebuje okoli 73 % jedrnih celic, 12 % eritrocitov in 15 % celičnega debrija. Viabilnost jedrnih celic je bila 92,5 %. Omenjenega presadka še nismo testirali pri presaditvi, a bo liza eritrocitov vsekakor del priprave presadka pri bodočih raziskavah. Lizo eritrocitov uporabljajo pri pripravah celic mnogi raziskovalci, ki pri presaditvah uporabljajo sortirane celice (Lin⁺, ...). Tudi Bubnic in Keating (2002) sta odstranila eritrocite in pri svojih presaditvah uporabila le enojedrne celice. Prihodnje presaditve bomo opravili po postopku, ki je pripet v Prilogi 1.

Ko smo želeli določiti optimalno gostoto celic v presadku, smo morali izbrati volumen medija (PBS), ki ga lahko še vbrizgamo v krvni obtok miši, ne da bi te doživele volumski šok. Objavljeni članki (Kovina in sod., 2013, Blomberg in sod., 1998, Rao in sod., 1997, ...) v svojih metodah opisujejo, da so mišim BALB/c presajali celice v 0,5 ml

(Stewart in sod., 1993 celo do 1 ml) pri posamezni injekciji. Miši imajo v krvnem obtoku okoli 77-80 μ l/g krvi, kar pomeni, da imajo 18 – 20 g miši 1,4 do 1,6 ml krvi, zato menimo, da ob presaditvi ne smejo prejeti več kot 300 μ l tekočine. Po naših izkušnjah je bila gostota celične suspenzije primerna, če ni presegala 10 milijonov celic na 100 μ l medija, vendar moramo gostoto celic ponovno oceniti, ko pri izolaciji celic ne bomo uporabljali heparina, ki je v našem primeru gostil suspenzijo in otežil presaditve.

Ena od neznank pri presaditvah je uspešnost injekcije celic v repno veno. Če celice vbrizgamo v podkožje, namesto v žilo, te celice obravnavamo kot nepresajene. Oseba, ki izvaja presaditve mora biti zelo izurjena.

Možni razlogi za odsotnost himerizma so zavrnitev celic, zapolnjenost niš, pomanjkanje proliferacije celic in drugi za sedaj še neznani razlogi

Kljub ustrezni sestavi presadka in navidezno ustrezni injekciji v repno veno pri prejemnicah nismo uspeli doseči vsaditve darovalčevih celic pri neobsevanih prejemnicah. Tehnična izvedba presaditve je le eden od možnih vzrokov za pomanjkanje himerizma. Obstaja možnost, da vsaditve ni, ker med celicami prejemnic in presajenimi celicami prihaja do zavrnitve. Pri našem raziskovalnem delu smo sicer z namenom čim večje tkivne skladnosti uporabili sev miši BALB/c AnNCrI, ki naj bi imele v splošnem zaradi sokrvnosti MHC skoraj identičen. Sev uporabljenih miši ima MHC haplotipa H2^d in ta haplotip naj bi imel zanemarljivo majhno imunoreaktivnost za H-Y antigen, to je z Y-kromosomom povezana histokompatibilnost (Nilsson in sod. (1997, 1999), Bubnic in Keating (2002), na podlagi objav Fierza s sod. (1982) ter Silvers in Wachtel (1977)). V zavrnitev presadka lahko vodi delovanje minorskih histokompatibilnostnih antigenov (angl. *minor histocompatibility antigens, MiHA*), ki lahko delujejo, četudi sta darovalec in prejemnik identična v MHC (Roopenian in sod., 2002). Zaradi možnosti, da so celice samca in samice med seboj imunoreaktivne, je potrebno opraviti dodatne raziskave. Opazovanje zdravja miši, ki so prejele presadek, sicer ni pokazalo znakov zavrnitve ali znakov bolezni presadka proti gostitelju (prejemnice niso bile videti bolne, niso imele griže, ni se jim razvil dermatitis; Seller, 1970, Duran-Struuk in Dysko, 2009).

Druga možnost za pomanjkanje himerizma pri nekondicioniranih miših je lahko pomanjkanje prostora v nišah KM (Nilsson in sod., 1997b). Kljub temu, da je številnim avtorjem uspelo dokazati, da za uspešno vsaditev miši ni potrebno kondicionirati (Micklem in sod., 1968, Brecher in sod., 1982, Saxe in sod., 1984, Sadelain in Wegman, 1989, Stewart in sod., 1993, Wu in Keating, 1993, Ramshaw in sod., 1995a in 1995b, Nilsson in sod., 1997 in 1999, Rao in sod., 1997, Blomberg in sod., 1998, Bubnic in Keating, 2002, Colvin in sod., 2004 in 2007; mnogi od teh pod vodstvom dr. Petra Quesenberryja), je še danes precej razširjena dogma, da je potrebno sprostiti niše pri prejemnicah z obsevanjem ali s kemoterapijo. Razloga za slabo vsaditev pri neobsevanih miših pa Wu in Keating (1993) ter Zhong in sod. (2002) niso videli v pomanjkanju prostora v nišah, temveč v neuspešni proliferaciji celic darovalca v prejemnikovem KM. Pokazali so, da so bile celice darovalca v prejemnikih prisotne vsaj 6 mesecev, vendar pa se niso delile, kot so se delile v obsevanih prejemnikih. Tudi Sadelain in sod. (1989) predvidevajo, da je razlog za

pomanjkanje ali nizek odstotek himerizma lahko v regulatornih mehanizmi, ki preprečujejo proliferacijo matičnih celic darovalca.

7.2 PRIHODNJE DELO

Naša nadaljnja prizadevanja za uspešno doseganje himerizma bodo usmerjena v izvedbo testa mešanih limfocitnih kultur, ki nam bodo pokazale, ali so celice med seboj imunsko neskladne.

V primeru, da so celice med seboj skladne, bomo nadaljevali s poskusom, kjer bomo uporabili rastni dejavnik granulocitne vrste (G-SCF, angl. *granulocyte-colony stimulating factor*), kar je glikoprotein, ki stimulira KM, da ustvarja granulocite in matične celice in jih sprošča v krvni obtok. Namen uporabe G-SCF je sprostitev niš KM prejemnic in upanje za uspešen dolgotrajen himerizem brez mieloablativnih postopkov, saj mieloablacija ni primerna za potrebe naših bodočih raziskav na geriatičnih miših, ker uniči imunski sistem, tega pa želimo ohraniti neoslabljenega.

V prihodnje bomo spremljali tudi vsaditev celic po izboljšanem postopku izolacije celic, pri katerem bomo uporabili jedrne celice KM ter medij brez heparina in FBS. V nadaljevanju pa je potrebno opraviti še preiskave presadka s pretočno citometrijo, kjer bi določili natančno število KMC, ter opraviti teste CFU, ki bi nam pokazali krvotvorno sposobnost matičnih in progenitorskih celic za proliferacijo in diferenciacijo v presadku.

7.3 SKLEPI

1. Za izolacijo celic KM je najprimernejši postopek trenja, saj smo z njim pridobili največje število celic, in sicer do 400 milijonov.
2. Naš poskus dosedanjih objav ni potrdil, saj pri šestih mladih in devetih starih miših BALB/c nismo dosegli zaznavne vsaditve darovalčevih celic KM po enem ali treh mesecih po presaditvi.
3. Himerizma nismo dosegli niti z enkratnimi niti z zaporednimi presaditvami celic KM.
4. Zaznavne vsaditve celic ni bilo niti v kostnem mozgu, niti v drugih organih.

8 POVZETEK

Miši so pred več kot šestimi desetletji postale pomemben model raziskovalnih in predkliničnih študij za preučevanje presaditev kostnega mozga (KM). KM je dinamično okolje znotraj ploščatih kosti, dolgih kosti, vretenc, medeničnih kosti in nekaterih kratkih kosti, kjer nastaja veliko število celic in se odvija izjemen spekter celičnih diferenciacij. Je glavno mesto nastajanja krvnih celic (hematopoeze), ki se diferencirajo iz KMC.

Pri študijah presaditev KM na miših raziskovalci večinoma uporabljajo mieloablativne postopke (obsevanje in uporaba kemoterapevtskih sredstev), ki so po splošno razširjeni dogmi nujni za sprostitev niš v KM prejemnika in uspešno vsaditev presajenih alogenskih celic. Pri nekaj več kot ducat študijah pa so uspešno dosegli vsaditev presajenih celic tudi pri nekondicioniranih mišjih prejemnicah. Te študije s bile podlaga za našo raziskavo, pri kateri smo želeli ugotoviti stopnjo himerizma po presaditvi celic KM nekondicioniranim mišjim prejemnicam.

V prvem delu naše raziskave smo želeli določiti najprimernejšo metodo za izolacijo celic kostnega mozga, s katero bi pripravili presadek s čim večjim številom viabilnih celic. Pri tem smo za izolacijo celic KM preizkusili postopka spiranja in trenja, z ali brez uporabe encima kolagenaze in dispaze. Spremljali smo tudi učinke različnih postopkov shranjevanja celic, barvanja celic, izolacije celic z ali brez lize eritrocitov in uporabo različnih medijev med izolacijo celic na kakovost presadka. V drugem delu raziskave smo pridobljene celice KM mišjih darovalcev injicirali v petnajst neobsevanih mišjih prejemnic (sev BALB/c) in izmerili stopnjo himerizma. Dodatno smo želeli ugotoviti ali s tremi zaporednimi presaditvami dosežemo večji himerizem kot z eno presaditvijo.

Analiza celičnih suspenzij s pretočnim citometrom po spiranju in trenju ni pokazala večjih razlik, v obeh primerih je bila viabilnost jedrnih celic >90 %. Za najprimernejšo metodo za izolacijo celic KM smo določili postopek trenja kosti, pri katerem smo uporabili po dve golenici, stegenici, nadlahtnici, črevnici in hrbtenico. S tem postopkom smo pridobili največje število celic, in sicer do 400 milijonov, kar je kar štirikrat več kot pri postopku spiranja kosti. Tako lahko s postopkom trenja prihranimo število uporabljenih miši in tudi potek same izolacije je hitrejši. Hkrati pa je trenje ugodnejše tudi zaradi dejstva, da se z njim pridobi večji odstotek progenitorskih celic, ki so v regijah endosta, v predelu KM ob kosti.

Uspešnost vsaditve darovalčevih celic smo po injekciji v repo veno preverjali z metodo PCR-RČ. Iz kosti prejemnic smo izolirali celice KM, izolirali DNA ter z analizo PCR-RČ določili količino prisotnosti moške DNA na podlagi umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili iz znanih mešanic DNA samice in samca (od 0,2 % do 100 % moške DNA). V PCR-RČ reakcijah smo uporabili SYBR Green in začetna oligonukleotida (ZO) Zfy1 (je na Y-kromosomu) in Bcl2 (referenčni gen). Učinkovitost pomnoževanja pri 400 nM ZO je bila 0,93 za Zfy1 in 0,98 za Bcl2. Presaditve KM pri šestih mladih in devetih starih miših niso pokazale vsaditve celic KM. V nekaterih primerih smo izmerili do 0,5 % vsaditev, kar je pod mejo kvantifikacije. Odsotnost himerizma smo najprej zaznali v skupini mladih prejemnic (slika 2.1, 4. skupina), zato smo želeli izboljšati postopek presaditve celic KM, kar smo opravili pri ostalih mladih prejemnicah (slika 2.1, 3. skupina). Opravili smo

dodatne teste (vzorčenje periferne krvi po presaditvi, barvanje celic s PKH26), s katerimi smo se želeli prepričati, da pri presaditvi celice dosežejo krvni obtok. V vzorcih krvi prejemnic takoj po injiciranju nismo izmerili prisotnosti Y-kromosoma, kar pomeni, da injiciranje ni bilo vedno uspešno.

Pri treh starih prejemnicah, ki so poginile po injiciranju tretje doze celic, smo odvzeli vzorce KM, in drugih tkiv, vranice, pljuč, jeter, ledvic in kožnega dela repa nad mestom injekcije. Celice darovalcev smo zaznali v repu (0,5 % do 2,5 % moške DNA) in pljučih (4,7 % do 8 % moške DNA). Rezultati torej kažejo na to, da delež celic verjetno ni dosegel periferne krvi ter da so se celice darovalcev po injiciranju ustavile v pljučih.

Avtorji pomanjkanje himerizma v KM nekondicioniranih prejemnic povezujejo s tremi glavnimi razlogi: a) prihaja do zavrnitve celic darovalca, b) niše v KM prejemnic so popolnoma zasedene in ni prostora za celice darovalca ter c) celice darovalca, ki prispejo v KM prejemnic, ne proliferirajo, temveč mirujejo. Razlogi bi lahko bili povezani tudi s samo tehnično izvedbo poskusa in pripravo presadka, ali pa z neučinkovito injekcijo v repno žilo prejemnic.

Z nadaljnjimi poskusi bomo skušali najti rešitve, ki bi vodile v uspešen himerizem pri nekondicioniranih miših, še posebej starih. Ob uspešni vsaditvi celic KM mladih darovalcev v stare prejemnice bi lahko preučevali morebitne pozitivne učinke presajenih mladih celic na oslabljeni imunski in krvotvorni sistem starih prejemnic. Tovrstne himere bi lahko postale dober model za preučevanje zdravljenja mnogih s starostjo povezanih bolezni.

9 VIRI

9.1 Citirani viri

- An N., Kang Y. 2013. Using quantitative real-time PCR to determine donor cell engraftment in a competitive murine bone marrow transplantation model. *Journal of Visualized Experiments*, 73, e50193: 1-6
- Arber C., Brenner M. K., Reddy P. 2013. Mouse models in bone marrow transplantation and adoptive cellular therapy. *Seminars in Hematology*, 50, 2: 131-144
- Askenasy N., Stein J., Yaniv I., Farkas D. L. 2003. The Topologic and Chronologic Patterns of Hematopoietic Cell Seeding in Host Femoral Bone Marrow after Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 9: 496-504
- Becker A. J., McCulloch E. A., Till J. E. 1963. [citirano] Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197: 452-454
- Blomberg M., Rao S., Reilly J., Tiarks C., Stefan P., Kittler E., Quesenberry P. 1998. Repetitive bone marrow transplantation in nonmyeloablated recipients. *Experimental Hematology*, 26: 320-324
- Brecher G., Endicott K. M., Gump H., Brawner H. P. 1948. Effects of X-ray on lymphoid and hemopoietic tissues of albino mice. *Blood*, 3, 11: 1259-1274
- Brecher G., Tjio J. H., Haley J. E., Narla J., Beal S. L. 1979. [izvleček] Transplantation of murine bone marrow without prior host irradiation. *Blood Cells*, 5: 237
- Brecher G., Ansell J. D., Micklem H. S., Tjio J. H., Cronkite E. P. 1982. Special proliferative sites are not needed for seeding and proliferation of transfused bone marrow cells in normal syngeneic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79: 5085-5087
- Bubnic S. J., Keating A. 2002. Donor stem cells home to marrow efficiently and contribute to short- and long-term hematopoiesis after low-cell-dose unconditioned bone marrow transplantation. *Experimental Hematology*, 30: 606-611
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J., Wittwer C. T. 2009. The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 4: 611-622
- Bydlowski S. P., Levy D., Ruiz J. M. L., Pereira J. 2013. Hematopoietic Stem Cell Niche: Role in Normal and Malignant Hematopoiesis. V: *Stem Cell Biology in Normal Life and Diseases*. Alimoghaddam K. (Ed). InTech: 17-32
<http://www.intechopen.com/books/stem-cell-biology-in-normal-life-and-diseases/hematopoietic-stem-cell-niche-role-in-normal-and-malignant-hematopoiesis>
(1. okt. 2014)
- Byrne P., Huang W., Wallace V. M., Shean M. K., Zhang Z., Zhong Q., Theodossiou C., Blakesley H., Kolls J. K., Schwarzenberger P. 2002. [izvleček] Chimerism analysis in

- sex-mismatched murine transplantation using quantitative real-time PCR. *BioTechniques*, 32, 2: 279-80, 282-4, 286
- Cerny J., Dooner M., McAuliffe C., Habibian H., Stencil K., Berrios V., Reilly J., Carlson J., Cerny A. M., d'Hondt L., Benoit B., Lambert J. F., Colvin G., Nilsson S., Becker P., Quesenberry P. 2002. Homing of Purified Murine Lymphohematopoietic Stem Cells: A Cytokine-Induced Defect. *J. Hematother. Stem Cell Research*, 11, 6: 913-922
- Challen G. A., Boles N., Lin K. K.-Y., Goodell M. A. 2008. Mouse Hematopoietic Stem Cell Identification and Analysis. *Cytometry Part A*, 75A: 14-24
- Colvin G. A., Lambert J.-F., Abedi M., Hsieh C.-C., Carlson J. E., Stewart F. M., Quesenberry P. J. 2004. Murine marrow cellularity and the concept of stem cell competition: geographic and quantitative determinants in stem cell biology. *Leukemia*, 18: 575-583
- Colvin G. A., Lambert J.-F., Dooner M. S., Cerny J., Quesenberry P. J. 2007. Murine Allogeneic In Vivo Stem Cell Homing. *Journal of Cellular Physiology*, 211, 2: 386-391
- Cui J., Wahl R. L., Shen T., Fisher S. J., Recker E., Ginsburg D., Long M. W. 1999. Bone marrow cell trafficking following intravenous administration. *British Journal of Haematology*, 107, 4: 895-902
- Čepin U. 2011. Genetska raznolikost in določanje virusa pahljačavosti listov vinske trte (GFLV). Doktorska disertacija. Ljubljana. Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta: 172 str.
- Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G., Morrison, S. J. 2012. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 481, 7382: 457-462
- Domen J., Wagers A., Weissman I. L. 2006. Bone marrow (hematopoietic) stem cells. V: *Regenerative medicine*. Winslow T. (Ed). ZDA, Department of Health and Human Services: 13-34
http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative_Medicine_2006.pdf
- dos Anjos Pires M., Palmeira C., Rodrigues P., Lopes C., Oliveira-Torres F. 2001. Establishment of a diploid reference value for DNA ploidy analysis by image cytometry in M cells. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 23, 6: 427-432
- Doulatov S., Notta F., Laurenti E., Dick J. E. 2012. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*, 10, 2: 120-136
- Duran-Struuck R., Dysko R. C. 2009. Principles of Bone Marrow Transplantation (KMT): Providing Optimal Veterinary and Husbandry Care to Irradiated Mice in KMT Studies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48, 1: 11-22
- El-Badri N., Wang B.-Y., Cherry, Good R. A. 1998. Osteoblasts promote engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology*, 26: 110-116

- Ellis S. L., Grassinger J., Jones A., Borg J., Camenisch T., Haylock D., Bertoncello I., Nilsson S. K. 2011. The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature. *Blood*, 118, 6: 1516-1524
- Endicott K.M., Gump H. 1947. Hemograms and myelograms of healthy female mice of C-57 brown and CFW strains. *Blood* (Pos. izdaja) 1: 61-63
- Fierz W., Brenan M., Müllbacher A., Simpson E. 1982. [izvleček] Non-H-2 and H-2-linked immune response genes control the cytotoxic T-cell response to H-Y. *Immunogenetics*, 15, 3: 261-270
- Ford C. E., Hamerton J. L., Barnes D. W., Loutit J. F. 1956. [citirano] Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*, 177: 452-454
- Fox J. G., Barthold S. W., Davisson M. T., Newcomer C. E., Quimby F. W., Smith A. L. (eds.) 2007. *The Mouse in Biomedical research*. 2nd ed. Volume IV. Immunology. New York, Elsevier, Inc.: 791 str.
- Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. 2001. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods*, 25, 386-401
- Guerrouahen BS1, Al-Hijji I, Tabrizi AR. 2011. Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia. *Stem Cells International*, 2011: 375857
- Haylock D. N., Williams B., Johnston H. M., Liu M. C. P., Rutherford K. E., Whitty G. A., Simmons P. J., Bertoncello I., Nilsson S. K. 2007. Hemopoietic Stem Cells with Higher Hemopoietic Potential Reside at the Bone Marrow Endosteum. *Stem Cells*, 25: 1062-1069
- Heazlewood S. Y., Oteiza A., Cao H., Nilsson S. K. 2014. Analyzing hematopoietic stem cell homing, lodgment, and engraftment to better understand the bone marrow niche. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1310: 119-128
- Hendrikx P. J., Martens A. C. M., Hagenbeek A., Keij J. F., Visser J. W. M. 1996. [izvleček] Homing of fluorescently labeled murine hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology*, 24: 129
- Hu K., Wang M., Fan C., Wang L., Guo M., Ai H. 2011. CM-DiI Labeled Mesenchymal stem cells homed to thymus inducing immune recovery of mice after haploidentical bone marrow transplantation. *International Immunopharmacology*, 11: 1265-1270
- Ifko M. 2011. Preživetje človeških matičnih celic v vzorcu shranjene popkovnične krvi. Diplomsko delo. Ljubljana. Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 58 str.
- Jacobson L. O., Simmons E. L., Marks E. K., Robson M. J., Bethard W. F., Gaston E. O. 1950. [citirano] The role of the spleen in radiation injury and recovery. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 35: 746-770
- Jang Y. Y., Ye Z., Cheng L.. 2011. Molecular Imaging and Stem Cell Research. *Molecular Imaging*, 10, 2: 111-122

- Jež M. 2008. Identifikacija celic z embrionalnimi lastnostmi v kostnem mozgu odraslega človeka. Diplomsko delo. Ljubljana. Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije: 60 str.
- Kiel, M. J., Radice, G. L., Morrison, S. J. 2007. Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell Stem Cell*, 1: 204-217
- Kovina M. V., Zuev V. A., Kagarlitskiy G. O. Khodarovich Y. M. 2013. Effect on lifespan of high yield non-myeloablating transplantation of bone marrow from young to old mice. *Frontiers in Genetics*, 4: 144
- Krinke G. J. 2004. Normative Histology of Organs. V: The Handbook of Experimental Animals. The Laboratory Mouse. Hedrich H. J., Bullock G., Petrusz P. (eds.) UK, Elsevier Ltd.: 133-166
- Kunisaki Y., Bruns I., Scheiermann C., Ahmed J., Pinho S., Zhang D., Mizoguchi T., Wei Q., Lucas D., Ito K., Mar J. C., Bergman A., Frenette P. S. 2013. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*, 502, 7473: 637-643
- Kunisaki Y., Frenette P. S. 2014. Influences of vascular niches on hematopoietic stem cell fate. *International Journal of Hematology*, 99, 6: 699-705
- Lambert J.-F., Carlson J.E., Colvin G.A., Quesenberry P.J. 2000. Evaluation of mouse whole body bone marrow cellularity and distribution of hematopoietic progenitors. *Experimental Hematology*, 28, 12: 1493
- Lambert J. F., Colvina G. A., Zhong S., Wang H., D'Hondt L., Abedi M., Frimberger A. E., Stewart F. M., Quesenberry P. J. 2002. [izvleček] H2-mismatched transplantation with repetitive cell infusions and CD40 ligand infusions without myeloablation. *British Journal of Haematology*, 119, 1: 155-163
- Lanzkron S. M., Collector M. I., Sharkis S. J. 1999. Hematopoietic Stem Cell Tracking In Vivo: A Comparison of Short-Term and Long-Term Repopulating Cells. *Blood*, 93, 6: 1916-1921
- Lapidot T., Dar A., Kollet O. 2005. How do stem cells find their way home? *Blood*, 106: 1901-1910
- Laroche V., McKenna D. H., Moroff G., Schierman T., Kadidlo D., McCullough J. 2005. Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples. *Transfusion*, 45: 1909-1916
- Li P., Zhang R., Sun H., Chen L., Liu F., Yao C., Du M., Jiang X. 2013. PKH26 Can Transfer to Host Cells In Vitro and Vivo. *Stem cells and development*, 22, 2: 340-344
- Lipoglavšek L., Avguštin G. 2000. Uporaba oligonukleotidnih sond in pretočne citometrije za analizo bakterijske združbe v bioloških čistilnih sistemih. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika, 76: 1
- Lo Celso C., Scadden D. 2007. Isolation and Transplantation of Hematopoietic Stem Cells (HSCs). *Journal of Visualized Experiments*, 2: 1-2

- Lo Celso C., Fleming H. E., Wu J. W., Zhao C. X., Miake-Lye S., Fujisaki J., Côté D., Rowe D. W., Lin C. P., Scadden D. T. 2009. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature*, 457: 92-96
- Lorenz E., Uphoff D., Reid T. R., Shelton E. 1951. [citirano] Modifications of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *Journal of the National Cancer Institute*, 12: 197-201
- Lorenz E., Congdon C. C. 1954. [citirano] Modification of lethal irradiation injury in mice by injection of homologous and heterologous bone. *Journal of the National Cancer Institute*, 14: 955-961
- Madaan A., Verma R., Singh A. T., Jain S. K., Jaggi M. 2014. A stepwise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. *Journal of Biological Methods*, 1, 1
- Mcculloch E. A., Siminovitch L., Till J. E. 1964. [citirano] Spleen-colony formation in anemic mice of genotype WW. *Science*, 144: 844-846
- Mendelson A. in Frenette P. S. 2014. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nature Medicine*, 20, 8: 833-846
- Micklem H. S., Clarke C. M., Evans E. P., Ford C. E. 1968 [citirano] Fate of chromosome-marked M bone marrow cells transfused into normal syngeneic recipients, 6, 2: 299-302
- Mimeault M., Batra S. K. 2006. Concise Review: Recent Advances on the Significance of Stem Cells in Tissue Regeneration and Cancer Therapies. *Stem Cells*, 24: 2319-2345
- Morisaki H., Morisaki T., Nakahori Y., Ogura H., Kanno H., Tani K., Kodo H., Fujii H., Asano S., Miwa S. 1988. Genotypic Analysis Using a Y-Chromosome-Specific Probe Following Bone Marrow Transplantation. *American Journal of Hematology*, 27: 30-33
- Nilsson S. K., Dooner M. S., Quesenberry P. J. 1997a. Synchronized Cell-Cycle Induction of Engrafting Long-Term Repopulating Stem Cells. *Blood*, 90, 11: 4646-4650
- Nilsson S. K., Dooner M. S., Tiarks C. Y., Weier H.-U., Quesenberry P. J. 1997b. Potential and Distribution of Transplanted Hematopoietic Stem Cells in a Nonablated Mouse Model. *Blood*, 89: 4013-4020
- Nilsson S. K., Dooner M. S., Weier H.-U., Frenkel B., Lian J. B., Stein G. S., Quesenberry P. J. 1999. Cells Capable of Bone Production Engraft from Whole Bone Marrow Transplants in Nonablated Mice. *Journal of Experimental Medicine*, 189, 4: 729-734
- Nilsson S. K., Johnston H. M., Coverdale J. A. 2001. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*, 97, 8: 2293-2299
- Nombela-Arrieta C., Pivarnik G., Winkel B., Canty K. J., Harley B., Mahoney J. E., Park S. Y., Lu J., Protopopov A., Silberstein L. E. 2013. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nature Cell Biology*, 15, 5: 533-543

- Osawa M., Hanada K.-I., Hamada H., Nakauchi H. 1996. [izvleček] Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell. *Science*, 273, 5272: 242-245
- Peters S. O., Bauermeister K., Simon J. P., Branke B., Wagner T. 2002. Quantitative polymerase chain reaction-based assay with fluorogenic Y-chromosome specific probes to measure bone marrow chimerism in mice. *Journal of Immunological Methods*, 260: 109-116
- Plett P. A., Frankovitz S. M., Orschell-Traycoff C. M. 2002. In vivo trafficking, cell cycle activity, and engraftment potential of phenotypically defined primitive hematopoietic cells after transplantation. *Blood*, 100: 3545-3552
- Plett P. A., Frankovitz S. M., Orschell C. M. 2003. Distribution of marrow repopulating cells between bone marrow and spleen early after transplantation. *Blood*, 102: 2285-2291
- Progatzy F., Dallman M. J., Lo Celso C. 2013. From seeing to believing: labelling strategies for in vivo cell-tracking experiments. *Interface Focus*, 3, 20130001
- Quesenberry P. J., Stewart M. F., Peters S., Nilsson S., Ramshaw H., Rao S., Tiarks C., Zhong S., Frimberger A., Reilly J. 1997. Engraftment of Hematopoietic Stem Cells in Nonmyeloablated and Myeloablated Hosts. *Stem Cells*, 15, 1: 167-170
- Quesenberry P. J., Colvin G., Abedi M. 2005. Perspective: Fundamental and clinical concepts on stem cell homing and engraftment: A journey to niches and beyond. *Experimental Hematology*, 33: 9-19
- Ramkumar C., Gerstein R. M., Zhang H. 2013. Serial Transplantation of Bone Marrow to Test Self-renewal Capacity of Hematopoietic Stem Cells In Vivo. *Methods in Molecular Biology*, 976: 17-24
- Ramshaw H. S., Rao S. S., Crittenden R. B., Peters S. O., Weier H.-U., Quesenberry P. J. 1995a. Engraftment of Bone Marrow Cells Into Normal Unprepared Hosts: Effects of 5-Fluorouracil and Cell Cycle Status. *Blood*, 86, 3: 924-929
- Ramshaw H. S., Crittenden R. B., Dooner M., Peters S. O., Rao S. S., Quesenberry P. J. 1995b. High Levels of Engraftment with a Single Infusion of Bone Marrow Cells Into Normal Unprepared Mice. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 1: 74-80
- Rao S. S., Peters O. S., Crittenden R. B., Stewart F. M., Ramshaw H. S., Quesenberry P. J. 1997. Stem cell transplantation in the normal nonmyeloablated host: Relationship between cell dose, schedule, and engraftment. *Experimental Hematology*, 25: 114-121
- Raspor, P. (ur.) 1996. Biotehnologija: Osnovna znanja. Ljubljana, Bia: 634 str.
- Riches A. C., Sharp J. G., Brynmor Thomas D., Vaughan Smith S. 1972. Blood volume determination in the mouse. *Journal of Physiology*, 228, 2: 279-284
- Rožman P., Jazbec J., Domanović D. 2011. Presaditve matičnih celic iz popkovnične krvi – dve desetletji kliničnih izkušenj. *Zdravniški Vestnik*, 81: 413-421
- Rožman P., Jež M. 2010. Matične celice in napredno zdravljenje (zdravljenje s celicami, gensko zdravljenje in tkivno inženirstvo) – Pojmovnik. Ljubljana, Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije: 90 str.

- http://www.dctis.si/wp-content/uploads/2014/02/SC_slovarcek_SLO20.pdf
- Sadelain M. W., Wegmann T. G. 1989. Delayed activation of quiescent donor hematopoietic stem cells in the host marrow cavity by anti-host monoclonal antibody. *Blood*, 74, 7: 2325-2329
- Sánchez-Guijo F. M., Orfao A., del Cañizo M. C. 2012. Bone marrow transplantation extends its scope. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 741: 121-134
- Saxe D. F., Boggs S. S., Boggs D. R. 1984. [izvleček] Transplantation of chromosomally marked syngeneic marrow cells into mice not subjected to hematopoietic stem cell depletion. *Experimental Hematology*, 12, 4: 277-283
- Schmitt C. E., Lizama C. O., Zovein A. C. 2014. From transplantation to transgenics: mouse models of developmental hematopoiesis. *Experimental Hematology*, 42, 8: 707-716
- Schofield R. 1978. [izvleček] The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4, 1-2: 7-25
- Selesniemi K., Lee H.-J., Niikura T., Tilly J. L. 2009. Young adult donor bone marrow infusions into female mice postpone age-related reproductive failure and improve offspring survival. *Aging*, 1, 1: 49-57
- Seller, M. J. 1970. Animal Models for Bone-marrow Transplantation. *Journal of Medical Genetics*, 7: 305
- Seme K., Poljak M. 1996. Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo – nova metoda za spremljanje poteka in zdravljenja virusnih okužb. *Medicinski razgledi*, 35: 59-74
- Shimoni A., Nagler A. 2001. Non-myeloablative stem cell transplantation (NST): chimerism testing as guidance for immune-therapeutic manipulations. *Leukemia*, 15, 1967-1975
- Silvers W. K., Wachtel S. S. 1977. [izvleček] H-Y antigen: behavior and function. *Science*, 195: 956-960
- Siminovitch L., Till J. E., McCulloch E. A. 1964. [citirano] Decline in colony-forming ability of marrow cells subjected to serial transplantation into irradiated mice. *Journal of Cellular Physiology*, 64: 23-31
- Simmons M. J. 1970. Animal Models for Bone-marrow Transplantation. *Journal of Medical Genetics*, 7: 305-309
- Sipkins D. A., Wei X., Wu J. W., Runnels J. M., Côté D., Means T. K., Luster A. D., Scadden D. T., Lin C. P. 2005. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature*, 435: 969-973
- Stewart F. M., Crittenden R. B., Lowry P. A., Pearson-White S., Quesenberry P. J. 1993. Long-Term Engraftment of Normal and Post-5-Fluorouracil Murine Marrow Into Normal Nonmyeloablated Mice. *Blood*, 81, 10: 2566-2571
- Sugiyama T., Nagasawa T. 2012. Bone Marrow Niches for Hematopoietic Stem Cells and Immune Cells. *Inflammation & Allergy- Drug Targets*, 11: 201-206

- Szilvassy S. J., Meyerrose T. E., Ragland P. L., Grimes B. 2001. Differential homing and engraftment properties of hematopoietic progenitor cells from murine bone marrow, mobilized peripheral blood, and fetal liver. *Blood*, 98: 2108-2115
- Šimc M., Strbad M., Jež M., Rožman P. 2011. Zdravljenje z matičnimi celicami. *Zdravniški vestnik*, 81: 634-644
- Takada A., Takada Y., Ambrus J. L. 1971a. [citirano] Proliferation of donor and bone-marrow cells in the spleens and bone marrows of unirradiated and irradiated adult mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 136, 1: 222-226
- Takada Y., Takada A. 1971b. [citirano] Proliferation of donor hematopoietic cells in irradiated and unirradiated host mice. *Transplantation*, 12, 4: 334-338
- Tario J. D., Humphrey K., Bantly A. D., Muirhead K. A., Moore J. S., Wallace P. K. 2012. Optimized Staining and Proliferation Modeling Methods for Cell Division Monitoring using Cell Tracking Dyes. *Journal of Visualized Experiments*, 70, e4287: 1-13
- Thomas E. D., Lochte H. L. Jr, Lu W. C., Ferrebee J. W. 1957. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *New England Journal of Medicine*, 257, 11: 491-496
- Till J. E., McCulloch E. A., Siminovitch L. 1964a. [citirano] A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51: 29-36
- Till J. E., McCulloch E. A., Siminovitch L. 1964b. [citirano] Isolation of variant cell lines during serial transplantation of hematopoietic cells derived from fetal liver. *Journal of the National Cancer Institute*, 33: 707-720
- Tortora G. J., Derrickson B. 2014. *Principles of Anatomy & Physiology*. 14th ed. USA, Wiley & Sons, Inc.: 1127 str.
- Ude C. C., Shamsul B. S., Ng M. H., Chen H. C., Norhamdan M. Y., Aminuddind B.S., Ruszymah B.H.I. 2012. Bone marrow and adipose stem cells can be tracked with PKH26 until post staining passage 6 in in vitro and in vivo. *Tissue and Cell*, 44: 156-163
- Unglaub Silverthorn D. 2013. *Human physiology*. 6th Edition. USA, Pearson Education, Inc.: 890 str.
- Wu D. D., Keating A. 1993. [izvleček] Hematopoietic stem cells engraft in untreated transplant recipients. *Experimental Hematology*, 21, 2: 251-256
- Xiao Y., Wang Y., Li L., Li Y.H., Pang Y., Song J.Y., Jiang Z.J. 2014. Homing of chloromethylbenzoyl ammonia-labeled bone marrow mesenchymal stem cells in an immune-mediated bone marrow failure mouse model *in vivo*. *Genetics and Molecular Research*, 13, 1: 11-21
- Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H., He X., Tong W. G., Ross J., Haug J., Johnson T., Feng J. Q., Harris S., Wiedemann L. M., Mishina Y., Li L. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425: 836-841

Zhong J. F., Zhan Y., Anderson W. F., Zhao Y. 2002. Murine hematopoietic stem cell distribution and proliferation in ablated and nonablated bone marrow transplantation. *Blood*, 100: 3521-3526

9.2 Drugi viri

Baebler Š., Čepin U., Hren M., Gruden K., Stegel V. 2011. Real-time PCR applications in medical research and diagnostics. Biosistemika, NIB. (ppt prezentacija)

Benton C. B. 2009. Bone marrow isolation, crushing technique. The Goodell Laboratory.
<https://www.bcm.edu/research/labs/goodell/index.cfm?pmid=17970>

Bersenev A. 2009. What is lineage-negative cells?
<http://stemcellassays.com/2009/11/what-is-lineage-negative-cells/> (1. sept. 2014)

Fuchs C. 2014. What is Flow Cytometry? Flow Cytometry Fascility. MUSC Department of Regenerative Medicine and Cell biology.
<http://regmed.musc.edu/flowcytometry/flowcytometry.html> (1. sept. 2014)

Institutional animal care and use committee (IACUC). 2014. Blood Collection: The Mouse.
<http://www.google.si/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0CCsQFjAB&url=http%3A%2F%2Fiacuc.ucsf.edu%2FPolicies%2FBloodCollectionMice.doc&ei=q7g7VL3IMuKu7Aa-3oHABQ&usq=AFQjCNHuIV4T2OJNLXWY0wmFytRhB0bBJA&sig2=Wlywc0-YETyKqw71eLBj0w&bvm=bv.77161500,d.ZGU> (1.apr. 2014)

Life technologies. 2012. *Real-time PCR handbook*. Life Technologies Corporation.

McGarry, M. 2014. Bone marrow transplantation in mice.
http://www.radsources.com/assets/library/Bone_Marrow_Transplantation_in_Mice_by_Mike_McGarry.pdf

Michalová J., Savvulidi F., Forgáčová K., Nečas E., Šefc L. 2014. Flow cytometry analysis of hematopoietic stem cells in murine bone marrow and spleen.
http://www.immunotech.cz/news/DNAVII/2_den/Blok_I/4_Michalova_Savvulidi_Bun_anal_2010.pdf (1. apr. 2014)

NIH. 2012. "Father of bone marrow transplantation," Dr. E. Donnall Thomas, dies.
<http://www.nhlbi.nih.gov/about/directorscorner/messages/father-of-bone-marrow-transplantation-dr-e-donnall-thomas-dies.html> (15. okt. 2014)

Russel E. S., Bernstein S. E. 2014. Biology of the Laboratory Mouse.
<http://www.informatics.jax.org/greenbook/frames/frame17.shtml> (28. sept. 2014)

Sigma-Aldrich. 2014. Optimizing qPCR.
https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/SAJ/Brochure/1/j_qpcr_techguide06.pdf (25. sept. 2014)

Sigma-Aldrich. 2014. PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling.

- <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/pkh26glbul.pdf> (25. sept. 2014)
- Skopec B., Cukjati M. 2014. Vpliv viabilnosti presadka na regeneracijo kostnega mozga po avtologni presaditvi KMC. V: Strokovni sestanek ZTMS in ZHS. Bled, 3. in 4. okt. 2014 (neobjavljeno).
- Thermo Scientific. 2014. NanoDrop Spectrophotometers. Assessment of Nucleic Acid Purity. T042 Rev 1/11
- Vrtovec B. 2014. Zdravljenje napredujelega srčnega popuščanja s krvotvornimi matičnimi celicami. V: Strokovni sestanek ZTMS in ZHS. Bled, 3. in 4. okt. 2014 (neobjavljeno).
- Wikipedia. 2014a. 7-Aminoactinomycin D
http://en.wikipedia.org/wiki/7-Aminoactinomycin_D (5. avg. 2014)
- Wikipedia. 2014b. Hematopoietic stem cell transplantation.
http://en.wikipedia.org/wiki/Hematopoietic_stem_cell_transplantation#Myeloablative_trantranspl (15. okt. 2014)
- Wikipedia. 2014c. SYBR Green I http://en.wikipedia.org/wiki/SYBR_Green_I (18. jul. 2014)
- Wikipedia. 2014d. Verižna reakcija s polimerazo.
http://sl.wikipedia.org/wiki/Veri%C5%BEna_reakcija_s_polimerazo (18. jul. 2014)
- ZTM. 2014a. Podatki iz svetovnega združenja.
<http://www.ztm.si/terapevtske-storitve/celicne-terapije/presaditev-krvotvornih-maticnih-celic/podatki-iz-svetovnega-zdruzenja/> (15. okt. 2014)
- ZTM. 2014b. Presaditev krvotvornih matičnih celic.
<http://www.ztm.si/terapevtske-storitve/celicne-terapije/presaditev-krvotvornih-maticnih-celic/> (15. okt. 2014)

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem se svojemu mentorju, izr. prof. dr. Primožu Rožmanu, dr. med., ki me je sprejel kot diplomantko in me aktivno vključil v proces raziskovanja. Hvala za zaupanje, spodbudo in strokovno pomoč pri raziskavi in izdelavi naloge.

Hvaležna sem celotni raziskovalni skupini na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, ki so me velikodušno sprejeli medse, z menoj odprto delili svoje znanje in izkušnje ter me navdušili za delo v celičnem laboratoriju. Še posebej sem hvaležna dr. Mojci Jež, dr. Jasmini Černe in Boštjanu Smrekarju, ki so mi ves čas nudili strokovno podporo in pomoč pri eksperimentalnem delu. Hvala tudi dr. Tanji Vranac, dr. Urbanu Švajgerju, dr. Tadeji Dovč Drnovšek, dr. Urošu Rajčeviču in drugim zaposlenim, ki so mi bili vedno pripravljeni priskočiti na pomoč.

Za strokovni pregled naloge se zahvaljujem recenzentu prof. dr. Marku Kreftu, mentorju izr. prof. dr. Primožu Rožmanu, dr. med., dr. Mojci Jež in dr. Jasmini Černe.

Zahvaljujem se tudi Zavodu RS za transfuzijsko medicino, ki mi je finančno omogočil izvedbo raziskave.

Zahvaljujem se dr. Tadeju Malovrhu iz Veterinarske fakultete v Ljubljani za njegovo svetovanje pri presaditvah. Hvaležna sem tudi dr. Nataši Toplak iz podjetja Omega d.o.o. in dr. Matjažu Hrenu iz Nacionalnega inštituta za biologijo in Biosistemi d.o.o. za nasvete pri izvajanju PCR analiz.

Iskreno se zahvaljujem vsem, ki ste mi kakor koli pomagali pri nastajanju tega dela.

Najlepša hvala tudi mojemu partnerju Bernardu in njegovima staršema Urški in Jožetu Veniger, ki so poskrbeli za najinega sina ter mi omogočili, da sem v miru lahko zaključila svoje delo. Vsem, vključno sinu Gabru, hvala za potrpežljivost in čedno mero prilagajanja.

PRILOGA: PROTOKOL TRENJA KOSTI ZA PRIDOBITEV CELIC KOSTNEGA MOZGA

Protokol je povzet po Ramkumar in sod. (2013), vključene so spremembe po avtorjih Lo Celso in Scadden (2007), McGarry (Bone marrow ...), Madaan (2014), Haylock in sod. (2007), Benton (2009) ter Duran-Struuck in Dysko (2009).

Material:

- | | |
|--|---|
| a) medij za pridobitev KM (RPMI+): | g) sterilna gaza |
| - brezbarvni RPMI-1640 z dodanim | h) steriliziran terilnik in pestilo |
| 25 mM HEPES (pH 7,0 – 7,5) in L- | i) petrijevke (60 mm) in centrifugirke |
| glutaminom (300 mg/l) | (50 ml) |
| - 1 mM EDTA | j) 40 µm-najlonska sita (Falcon) |
| - 1X PenStrep (penicilin (100 E/ml) + | k) 30 µm-najlonska sita (Miltenyi) |
| streptomycin (100 µg)) | l) Pasteurjeve pipete |
| b) PBS | m) pipete in konice za pipete s filtrom |
| c) 1X PharmLyse Buffer | n) epice |
| d) 70% etanol | o) centrifuga z nadzirano temperaturo |
| e) razkužilo Asepsol (5% raztopina) | p) brezprašna komora |
| f) sterilna rezila (2 kosa), škarje (2 kosa) | q) kadička z ledom |
| in pincete (2 kosa) | |

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

Postopek:

1. Evtanazirane miši za 5 minut potopite v 5% raztopino Asepsol. Za tem jih položite na sterilno podlago. Ves čas ekstrakcije vse dobro razkužujte z alkoholom.
2. Kožo zarezite na hrbtnem delu in jo s prsti povlecite narazen navzgor in navzdol. *Škarje in pinceto, ki ju uporabite za rezanje kože, zavržite in pri nadaljnjem delu uporabite svež komplet.*
3. Z rezi odstranite glavne kosti: po dve golenici (*tibia*), stegnenici (*femur*), nadlahtnici (*humerus*) in črevnici (*ilium*).
4. Golenico odstranite tako, da zarezete v vezivno tkivo nad kolonom in v mišice pod kolonom. Za tem zarezite skozi koleno, ločite golenico in jo potegnite ven iz kože. *Pri odstranjevanju bodite previdni, da ne polomite kosti.*
5. S škarjami nato od golenice ločite še stopalo in odstranite mišice, kolikor gre. Kost postavite v RPMI+ na ledu.
6. Steglenico odstranite tako, da prerežete mišice ter jih postrgate stran. Izpahnite jo iz sklepa ter položite v medij.
7. Na enak način izrežite še obe nadlahtnici in obe črevnici.
8. Odstranjene kosti, ki so se jih držijo mišice in vezivo, za 5 minut položite v 60 mm petrijevko na ledu, ki vsebuje mrzel medij za pridobitev KM, da se tkivo zmehča.
9. Za odstranitev hrbtenice odrežite rep in nato režite ob hrbtenici spodaj, levo in desno, pri čemer pazite, da ne zarezete v peritonej.
10. Pripravite sveže rezilo (skalpel).

11. Vsako odstranjeno kost posebej primite s pinceto in jo na sterilni podlagi očistite mišičnega in vezivnega tkiva. Tudi hrbtenico dobro očistite, jo na štirih mestih prerežite in s pomočjo igle odstranite tudi hrbtenjačo.
12. Vse kosti obrišite z gazo in jih položite nazaj v RPMI+. Videz kosti po čiščenju prikazuje slika 5.1.1.1 (levo).
13. Očiščene kosti za 2 minuti namočite v 70% etanolu.
14. Kost nato prenesite v PBS, s čimer se spere etanol ter jih postavite v petrijevko z medijem za pridobitev KM.
15. TRENJE: Očiščene kosti prenesite v sterilni terilnik, ki vsebuje nekaj ml medija za pridobitev KM (običajno se za kosti ene miške porabi okoli 6 ml medija).
16. S tolkačem strite kosti v fragmente. Najprej strite kosti (golenici, stegenici, nadlahtnici in črevnici) in nato posebej hrbtenico. Trite toliko časa, dokler se sliši »škrtanje«, pri čemer bodite pozorni, da kosti ne strete v fin prah.
17. Po trenju suspenzijo vbrizgavajte in izbrizgavajte s pipeto, da premešate celice, in jih odpipetirate skozi 40 µm-najlonsko sito v 50 ml-centrifugirko. Pred filtriranjem mrežo sita omočite z medijem.
18. Kostem, ki ostanejo v terilniku ponovno dodajte medij in ponovite trenje, celice premešajte s pipeto in jih odpipetirajte skozi 40 µm-najlonsko sito v centrifugirko. Kost, ki ostanejo, so po trenju zelo svetle (slika 5.1.2.1, desno).
19. Enak postopek ponovite pri trenju hrbtenice. To je najbolje narediti s svežim sitom in ločeno centrifugirko.
20. Ko imate celično suspenzijo zbrano, jo ponovno prefiltrirajte skozi 40 µm-najlonsko sito. Po filtraciji z medijem še malce sperite sito.
21. Celično suspenzijo nato centrifugirajte 5 minut pri 490 xg, pri 4 °C.
22. Supernatant previdno odstranite in usedlino pretresite (in vorteksirajte na nizkih obratih), preden nadaljujete.
23. LIZA ERITROCITOV: Celice resuspendirajte v 5 ml 1X PharmLyse Buffer za 3 min v temi. Po poteku treh minut, celice takoj sperite s 30 ml PBS in centrifugirate 5 minut pri 490 xg.
24. Supernatant previdno odstranite tako, da iz obeh centrifugirk vse celice združite v eno ter ponovno sperite s 30 ml PBS.
25. Suspenzijo ponovno centrifugirajte 5 minut pri 490 xg, pri 4 °C in odstranite supernatant in usedlino pretresite in vorteksirajte na nizkih obratih.
26. Celice postavite v ledeno kopel in odvzemite vzorec za štetje celic.
27. PRIPRAVA ZA PRESADITEV: Preračunajte, v kolikšnem volumnu PBS morate resuspendirati celice, da boste lahko pripravili brizge za posamezne presaditve (brizge za presaditev ter ena rezervna). Pri tem morate upoštevati, da boste volumen suspenzije povečali za 200 µl pri spiranju 30 µm-sita (Miltenyi).
28. Pripravite epico, v katero boste prefiltrirali celično suspenzijo, in nanjo postavite (držite) 30 µm-sito. S 100 µl PBS zmočite sito in nato skozi vbrizgnite celično suspenzijo. Ker se celice oprimejo sita, s pomočjo Pasteurjeve pipete celice pihnite navzdol. Za tem sito sperite s 100 µl ter ponovno pihnite s Pasteurjevo pipeto.
29. Čim prej opravite presaditev celic. Vsako posamezno brizgo je najbolje napolniti tik pred presaditvijo vsaki posamezni prejemnici.