

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tjaša COF

**MERJENJE CITOTOKSIČNOSTI S POMOČJO
PRIMARNIH OSTEOGENIH CELIČNIH KULTUR**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tjaša COF

**MERJENJE CITOTOKSIČNOSTI S POMOČJO PRIMARNIH
OSTEOGENIH CELIČNIH KULTUR**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**CYTOTOXICITY TESTING WITH PRIMARY OSTEOGENIC CELL
CULTURES**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek Univerzitetnega študija 2. bolonjske stopnje programa Molekulska biologija. Delo je bilo v celoti opravljeno v podjetju Educell d.o.o.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je na seji dne 9.3.2012 za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Miomirja Kneževića, za somentorja dr. Lenarta Girandona, za recenzentko pa prof. dr. Damjano Drobne.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Marko KREFT
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo

Član: prof. dr. Miomir KNEŽEVIĆ
Educell, d.o.o., Ljubljana

Član: dr. Lenart GIRANDON
Educell, d.o.o., Ljubljana

Član: prof. dr. Damjana DROBNE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Magistrska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Tjaša Cof

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK 57:576157.083.36(043.3)=163.6
- KG Merjenje citotoksičnosti/celične linije/primarne celične kulture/
biomateriali/zdravila/sistem ekstrakcije/direktni kontakt
- AV COF, Tjaša, univerzitetni biotehnolog (UN)
- SA KNEŽEVIĆ, Miomir/GIRANDON, Lenart
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2013
- IN MERJENJE CITOTOKSIČNOSTI S POMOČJO PRIMARNIH OSTEOGENIH
CELIČNIH KULTUR
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. Stopnja)
- OP VII, 50 str., 21 sl., 46 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V okviru magistrskega dela smo preučevali učinkovitost metod, ki se pri merjenju citotoksičnosti najpogosteje uporabljajo, ter obenem skušali določiti vpliv tipa celične kulture na ovrednotenje citotoksičnosti. V tkivnem inženirstvu se vse bolj uporabljajo biomateriali in za razvoj le-teh je prvotno potrebno testiranje citotoksičnosti. Pri tem je poleg izbire metode, s katero se citotoksičnost najbolje ovrednoti, pomemben tudi celični tip. Najpogosteje se v študijah citotoksičnosti uporabljajo nesmrtno celične linije, vendar lahko zaradi drugačne celične funkcije in mehanizma toksičnosti pride do lažnih rezultatov. Zato smo testiranja citotoksičnosti izvedli na celični liniji L929 ter primarnih celičnih kulturah osteoblastov in MSC (angl. *mesenchymal stem cells*). Citotoksičnost smo merili s sistemom ekstrakcije in s sistemom direktnega kontakta. Kot teste sistema ekstrakcije smo izvajali test s kalceinom, test MTT, test barvanja s tripan modrim in test LDH, pri čemer smo kot toksično substanco uporabili fenol v 3 različnih koncentracijah. Z metodo direktnega kontakta smo testirali 2 certificirana, 2 validirana in 1 neznani material. Poleg razlik med metodami, rezultati kažejo tudi na različno občutljivost, ne le med celično linijo in primarnima kulturama, temveč tudi med osteoblasti in MSC. Zato sklepamo, da je v študijah biokompatibilnosti pomembna izbira kombinacije več metod ter izbire tistega celičnega tipa, ki bo v stiku z biomaterialom *in vivo*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND M. Sc. Thesis
- DC 57:576157.083.36(043.3)=163.6
- CX cytotoxicity testing/cell lines/primary cell cultures/biomaterials/drugs/
extraction testing system/direct contact testing system
- AU COF, Tjaša, univ. bioteh. (UN)
- AA KNEŽEVIĆ, Miomir/GIRANDON, Lenart
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2013
- TI CYTOTOXICITY TESTING WITH PRIMARY OSTEOGENIC CELL CULTURES
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
- NO VII, 50 p., 21 fig., 46 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB In this thesis we analyzed the effectiveness of the methods that are most commonly used in the measurement of cytotoxicity. We also tried to determine the impact of cell culture types on the evaluation of cytotoxicity. Biomaterials have been increasingly used in tissue engineering and cytotoxicity testing is initially needed for their development. In addition to choosing the method for the best evaluation of cytotoxicity, the cell type is also important. Immortal cell lines are most commonly used in the cytotoxicity studies, but due to different cellular functions and mechanism of toxicity, false results can occur. Therefore, cytotoxicity tests were carried out on the L929 cell line and primary cell cultures of osteoblasts and mesenchymal stem cells (MSC). Cytotoxicity was measured with the extraction testing system and direct contact testing system. The extraction testing system included calcium-released assay, MTT assay, trypan blue assay and LDH assay, phenol in 3 different concentrations being used as a toxic substance. With the method of direct contact, we tested 2 certified, 2 validated and 1 unknown material. In addition to differences between the methods, the results also indicate varying degrees of sensitivities, not only between the cell line and primary cultures but also between osteoblasts and MSC. We therefore conclude that a combination of several methods and a cell type that will be in contact with biomaterial *in vivo* are significant in the biocompatibility studies.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
1 UVOD	1
1.1 PROBLEM	1
1.2 NAMEN	3
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 CITOTOKSIČNOST	4
2.2 TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI	4
2.2.1 TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI S SISTEMOM EKSTRAKCIJE	5
2.2.1.1 Kalcein	5
2.2.1.2 MTT	5
2.2.1.3 Barvanje s tripan modrim	6
2.2.1.4 LDH	6
2.2.2 Testiranje citotoksičnosti s sistemom direktnega kontakta	7
2.3 FENOL KOT POZITIVNA KONTROLA	7
2.4 CELIČNE KULTURE	8
2.4.1 Primarna celična kultura	8
2.4.1.1 Osteogena celična kultura	8
2.4.2 Celična linija	11
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.2 METODE DELA	15
3.2.1 Gojenje celic	15
3.2.2 Odmrzovanje in zamrzovanje celic	15
3.2.3 Štetje celic	16
3.2.4 Tripsinizacija	16
3.2.4.1 Celice L929 v gojilni posodi s površino 25 cm ²	16
3.2.4.2 Primarne celične kulture v gojilni posodi s površino 25 cm ²	17
3.3 TESTI CITOTOKSIČNOSTI S SISTEMOM EKSTRAKCIJE	17
3.3.1 Test s kalceinom	18
3.3.2 Test MTT	18
3.3.3 Barvane s tripan modrim	18
3.3.4 Test LDH	19

3.4	TEST CITOTOKSIČNOSTI S SISTEMOM DIREKTNEGA KONTAKTA	20
4	REZULTATI	21
4.1	CITOTOKSIČNOST S SISTEMOM EKSTRAKCIJE	21
4.1.1	Primerjava metod ugotavljanja citotoksičnosti	21
4.1.1.1	Testiranje na L929	21
4.1.1.2	Testiranje na osteoblastih	23
4.1.1.3	Testiranje na MSC	26
4.1.2	Primerjava celic	28
4.1.2.1	Test s kalceinom	28
4.1.2.2	Test MTT	29
4.1.2.3	Test barvanja s tripan modrim	30
4.1.2.4	TEST LDH	31
4.2	CITOTOKSIČNOST S SISTEMOM DIREKTNEGA KONTAKTA	33
4.2.1	Sistem direktnega kontakta na validiranih in certificiranih materialih	33
4.2.2	Sistem direktnega kontakta na neznanem vzorčnem materialu	37
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	38
5.1	CITOTOKSIČNOST S SISTEMOM EKSTRAKCIJE	38
5.1.1	Primerjava metod	38
5.1.2	Primerjava celic	41
5.2	CITOTOKSIČNOST S SISTEMOM DIREKTNEGA KONTAKTA	42
5.3	PRIMERJAVA REZULTATOV EKSTRAKCIJSKEGA TESTA IN DIREKTNEGA KONTAKTA	44
6	POVZETEK	45
7	VIRI	47
7.1	CITIRANI VIRI	47
7.2	DRUGI VIRI	50

KAZALO SLIK

Slika 1: Kristali formazana v celici	6
Slika 2: Shematični prikaz kvantitativnega testa LDH	6
Slika 3: Osteoblasti - 72 h po nasaditvi v 25 cm ² gojilno posodo	8
Slika 4: Kostna premena	9
Slika 5: Diferenciacija mezenhimskih matičnih celic	10
Slika 6: MSC - 72 h po nasaditvi v 25 cm ² gojilno posodo	11
Slika 7: Tipi celičnih kultur	12
Slika 8: L929 - 4.dan po nasaditvi v 25 cm ² gojilno posodo	12
Slika 9: Shema koncentracijskega in časovnega poteka testov sistema z ekstrakcijo	17
Slika 10: Primerjava metod s sistemom ekstrakcije na celicah L929	23
Slika 11: Primerjava metod s sistemom ekstrakcije na osteoblastih	25
Slika 12: Primerjava metod s sistemom ekstrakcije na celicah MSC	27
Slika 13: Test s kalceinom	28
Slika 14: Test MTT	29
Slika 15: Test barvanja s tripan modrim	30
Slika 16: Test LDH	31
Slika 17: Sistem direktnega kontakta na validiranih in certificiranih materialih, 1. dan	33
Slika 18: Sistem direktnega kontakta na validiranih in certificiranih materialih, 3. dan	34
Slika 19: Sistem direktnega kontakta na validiranih in certificiranih materialih, 7. dan	35
Slika 20: Sistem direktnega kontakta na validiranih in certificiranih materialih, 8. dan	36
Slika 21: Sistem direktnega kontakta na neznanem vzorčnem materialu	37

1 UVOD

1.1 PROBLEM

In vitro ovrednotenje citotoksičnosti biomaterialov je prvi korak v študijah biokompatibilnosti, pri čemer so za izvajanje metod, ki temeljijo na detekciji sprememb v celični rasti in morfologiji, najpogosteje uporabljene nesmrtnne celične linije (Kirkpatrick in sod., 1998; Ignatius in Claes, 1996). Vendar pa to ne sovпада nujno z odzivom celičnega tipa, ki pride v stik z materialom *in vivo*. Zato je bolj relevantno *in vitro* testiranje s specifičnim celičnim tipom.

Primarne celične kulture imajo morfološke in biokemijske karakteristike, ki so podobne tistim v izvornem organu. V primerjavi s primarnimi kulturami so celične linije bolj okarakterizirane, bolj homogene, gojenje in ponovljivost rezultatov sta enostavnejša. Vendar so celične linije zelo spremenjene, so transformirane in nesmrtnne, zaradi česar ne odražajo nujno stanja izvornega tkiva (Ekwall in sod., 1990).

V raziskavah citotoksičnega vpliva substanc se celične kulture uporabljajo tako za ugotavljanje kvarnega vpliva na bazalne, kot tudi na specializirane celične funkcije. Oba nivoja citotoksičnosti lahko ugotavljamo le na primarnih celičnih kulturah, saj najpogosteje uporabljene celične linije nimajo več specifične funkcije in na teh celicah lahko spremljamo le bazalne celične funkcije. Uporaba specializiranih celic je tako omogočila raziskave, katerih namen je ugotoviti vpliv toksične substance na preživetje in normalno funkcijo točno določenega tipa celic (Ekwall in sod., 1990).

Ena najbolj izjemnih lastnosti živih bitij je njihova sposobnost popravila (regeneracije) poškodb tako mehkih kot tudi kostnih tkiv. Kost je izredno dejaven organ, v katerem nenehno potekajo procesi premene (angl. *remodeling*), ki omogočajo prilagajanje na mehanski stres, ohranjanje zdravega tkiva in popraviljanje majhnih poškodb. Za ohranitev zdravega tkiva je potrebno vzdrževanje ravnovesja med osteoklastno resorpcijo in osteoblastno sintezo kostnega tkiva. Z naraščajočo starostjo ali razvojem nekaterih prirojenih bolezni se sposobnost telesa, da ohranja to ravnovesje in popravi poškodbe kostnega tkiva, zmanjšuje. Naravno popravilo kosti lahko pripelje do neidealne zacelitve, kar je največkrat posledica obsežne izgube tkiva, infekcije, zdrobljene kosti ali posebnega zdravljenja (npr. radioterapija), kjer so naravni procesi popravila omejeni (Monaco in sod, 2011). Zato se kostno tkivo pogosto nadomešča z različnimi vsadki. Trenutno se pri kirurškem zdravljenju kosti uporabljajo a) avtografiti: odvzem zdravega tkiva in transplantacija na poškodovano mesto istega pacienta, b) alografiti: odvzem tkiva darovalca in transplantacija v pacienta, c) sintetični materiali, kot so kovina, plastika in različni keramični materiali, d) rastni faktorji in zdravila ali e) kombinacije sintetičnih materialov z rastnimi faktorji in zdravili. Kljub temu, da imajo avtografiti vse komponente, potrebne za zdravljenje kosti in so zato visoko cenjeni, imajo tako kot alografiti številne pomanjkljivosti, kot so visoka cena operacije, možnost infekcije in propad vsadka. Poleg tega je tveganje zdravljenja z alografiti tudi imunogenost in tveganje prenosa bolezni, pri zdravljenju z avtografiti pa so pogoste komplikacije na mestu odvzema.

Tkivno inženirstvo kosti je zasnovano tako, da so tako kot pri avtografitih prisotne vse komponente (ekstracelularni matriks, celice, rastni faktorji, signalne molekule), zato razvoj takega načina zdravljenja daje velika pričakovanja. Pri *in vivo* pristopih se na mesto poškodbe vsadi material s signalnimi molekulami in rastnimi faktorji, kar stimulira proliferacijo celic iz telesa. Pri *in vitro* pristopih pa gre sprva za izolacijo pacientu lastnih celic, ki se jih kasneje lahko namnoži, nato pa za nasaditev celic na porozen, biorazgradljiv material (Martino in sod., 2012). Ne glede na to, ali gre za pripravo nosilca s celicami ali brez njih, se navadno uporablja material, ki je porozen. Le-ta ne sme biti citotoksičen in mora olajšati celično proliferacijo, migracijo in diferenciacijo (Monaco in sod., 2011). Zato je izbira najustreznejšega materiala eden ključnih korakov v razvoju tkivno inženirskih kostnih nadomestkov (Martino in sod., 2012).

Primaren namen kostnih vsadkov je induciranje naravnega popravljanja poškodovanega tkiva. Največji izziv v razvoju kostnih nadomestkov je možnost zagotavljanja sprva dobre mehanske stabilnosti, kasneje, po implantaciji, pa hitre osteointegracije in resorpcije. Materiali, ki to omogočajo, so narejeni iz hidroksilnih kislin, kot sta polilaktična in poli(mlečna-ko-glikolna) kislina (Zhang in Ma, 1999). Lastnosti, ki povzročajo toksičnost materialov, so struktura, kemijska sestava in produkti, ki nastajajo pri razgradnji, kar posledično vodi v oksidativni stres, vnetje in imunski odgovor (Chowdhury in sod., 2013).

Za aplikacije tkivnega inženirstva je biomaterial navadno pripravljen kot nosilec (angl. *scaffold*) za specifičen celični tip. Navadno se v ta namen materiale testira z vsaj enim celičnim tipom, vendar je za identifikacijo ustreznosti biomateriala za specifične aplikacije pogostejša kombinacija več pristopov (Neuss, 2008).

1.2 NAMEN

Ker je za razvoj novih biomaterialov prvotno potrebno testiranje morebitne citotoksičnosti materiala, smo se v tej nalogi osredotočili na primerjavo učinkovitosti metod, ki se pri merjenju citotoksičnosti najpogosteje uporabljajo. Skušali smo najti kombinacijo metod, ki najbolje opišejo vpliv izbrane substance na celično rast in proliferacijo ter ugotoviti, kako pomembna je izbira celičnega tipa pri testiranju biomaterialov ter ovrednotiti razlike med uporabo primarne kulture in celične linije.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Pričakovali smo, da se bodo rezultati citotoksičnosti, določene z različnimi metodami, zaradi uporabe različnih biomarkerjev, med seboj delno razlikovali. Poleg tega se metode, ki smo jih v okviru naloge uporabili, razlikujejo tudi glede na to, ali temeljijo na uporabi sprememb v permeabilnosti celične membrane ali stopnji aktivnosti nekega encima, iz česar smo sklepali na večjo primerljivost citotoksičnosti tistih metod, ki temeljijo na isti spremembi. Pričakovali smo tudi, da se bodo primarne celične kulture na izbrano citotoksično substanco odzvale drugače kot celične linije.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CITOTOKSIČNOST

Citotoksičnost primarno pomeni potencialno povzročitev celične smrti. Citotoksičnost je eden najpogostejših eksperimentalno določenih bioloških parametrov. Manj sofisticirane metode, kot je spremljanje morfologije celic pod mikroskopom ter barvanje mrtvih celic s tripan modrim in štetje v števeni komori, s katerima ugotavljamo stanje kultur, se v celičnem in tkivnem inženirstvu uporabljajo dnevno. S testi citotoksičnosti pa lahko enostavno izmerimo občutljivost celic na določeno koncentracijo toksina. Nizke koncentracije substance v celici povzročijo fiziološke spremembe, do toksičnih efektov kot sta nekroza in apoptoza pa pride pri višjih koncentracijah. V sesalskih celicah, ne glede na mehanizem celične smrti, po interakciji s toksično substanco pride do serije dramatičnih sprememb v strukturi in morfologiji celice, ki vodijo v izgubo membranske integritete (Leist in Jäättelä, 2001). Te spremembe v celični zgradbi so nepopravljive in omogočajo prosto prehajanje prej izločenih molekul v notranjost celice ter prehajanje encimov iz celice v medij (Riss, 2004). Zato je določanje znotrajceličnih encimov v zunajceličnem okolju osnova številnih testov citotoksičnosti (Cho in sod., 2008).

2.2 TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI

Za opredelitev morebitne toksičnosti materialov ali substanc se je tradicionalno uporabljalo teste na laboratorijskih živalih *in vivo*. Zaradi etičnih pomislekov, implementacije principa 3R (angl. *replacement, reduction, refinement*) ter visokih stroškov testiranj pa se vse več uporablja teste citotoksičnosti *in vitro* (Eisenbrand in sod., 2002). *In vitro* merjenje citotoksičnosti se torej uporablja kot alternativna oz. komplementarna metoda testiranju na živalih, s katero z določanjem deleža mrtvih celic po izpostavljenosti celic substancam ugotavljamo citotoksičen vpliv le-te (Ceriotti in sod., 2007). Testiranje celične toksičnosti največkrat temelji na določanju izgube membranske integritete, sprememb metabolne aktivnosti celic ali spremembah v celični morfologiji in delitvi (Cho in sod., 2008). Z *in vitro* testi določamo bazalno citotoksičnost, torej sposobnost substance, da povzroči celično smrt, ki je posledica okvarjenega delovanja osnovnih celičnih funkcij. Poleg tega lahko določamo tudi vpliv substance na specifično celično funkcijo, ki je bolj občutljiva in enako pomembna, kot bazalna citotoksičnost. Vendar danes še vedno večina *in vitro* testov citotoksičnosti zaznava celično smrt, torej le bazalno citotoksičnost. Z upoštevanjem koncentracije toksične substance in časa izpostavljenosti le-tej ter opazovanjem celičnega cikla, lahko dobimo podrobnejše informacije o mehanizmu in tipu citotoksičnosti (Eisenbrand in sod., 2002). *In vitro* testiranje citotoksičnosti po standardu ISO vključuje le testiranje bazalne citotoksičnosti, vendar z uporabo treh sistemov: sistema ekstrakcije, sistema direktnega kontakta in agarne difuzije (ISO 10993-5).

2.2.1 Testiranje citotoksičnosti s sistemom ekstrakcije

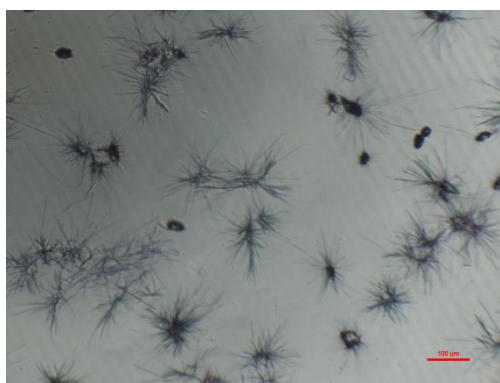
Sistem ekstrakcije omogoča tako kvalitativno kot tudi kvantitativno določanje citotoksičnega vpliva (ISO 10993-5). Uporablja se za določanje citotoksičnosti tekočin in biomaterialov. Pri kvantitativnem določanju se topne snovi iz biomateriala med namakanjem izločijo v gojišče, ki ga dodamo celični kulturi. Celice tako niso v direktnem stiku z materialom (Murray in sod., 2007). Metode sistema ekstrakcije ugotavljajo citotoksičnost glede na spremembe v strukturi membrane ali metabolni aktivnosti celice. Poškodbe celične membrane določamo s privzemom barvila, za katerega je celica navadno neprepustna (tripan modro) (Eisenbrand in sod., 2002) ali s privzemom in sprostitvi barvila, ki običajno ostane v celici (nevtral rdeče) (Weyermann in sod., 2005). Membransko integriteto lahko ovrednotimo tudi z določanjem sproščenega znotrajceličnega encima. Ti encimi so navadno porazdeljeni znotraj celice, vendar njihova aktivnost, kot rezultat celične smrti, v zunajceličnem okolju signifikantno naraste. Encimi, ki se pri tej vrsti testov uporabljajo in so prisotni v vseh celicah, so laktat dehidrogenaza (LDH), adenilat kinaza in gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) itd. (Cho in sod., 2008). Metabolno aktivnost živih celic lahko merimo s kolorimetričnimi metodami z merjenjem nastanka formazanskega produkta ali ključnega metabolita ATP (Weyermann in sod., 2005).

2.2.1.1 Kalcein

Kalcein/AM je barvilo, ki lahko prehaja v notranjost celic. Žive celice imajo, za razliko od mrtvih, aktivne encime esteraze, ki katalizirajo pretvorbo kompleksa kalcein/AM v zeleni fluorescentni produkt. Emisijo svetlobe merimo pri valovni dolžini 485 nm, ekscitacijo pa sprožimo pri 530 nm. Izmerjena fluorescenca je proporcionalna številu živih celic.

2.2.1.2 MTT

Kolorimetričen test MTT temelji na aktivnosti mitohondrijskega encima sukcinat dehidrogenaze, ki tetrazolijevo sol 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolni bromid reducira v formazan, netopen produkt vijolične barve. Po raztapljanju v kislem izopropanolu produkt spektrofotometrično kvantificiramo in določimo delež živih, metabolno aktivnih celic (Mosmann, 1983).



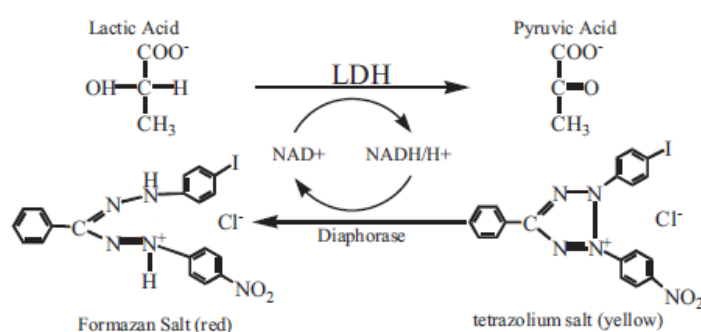
Slika 1: Kristali formazana v celici – 400x povečava

2.2.1.3 Barvanje s tripan modrim

Barvilo tripan modro omogoča določanje celične viabilnosti, saj preko poškodovane celične membrane vstopa v znotrajcelični prostor, medtem, ko nepoškodovana membrana za barvilo ni prepustna. Tako pod svetlobnim mikroskopom enostavno ločujemo med modrimi - mrtvimi in neobarvanimi - živimi celicami.

2.2.1.4 LDH

Laktat dehidrogenaza (LDH) je znotrajcelični encim, ki ga najdemo v mitohondrijih in citoplazmi vseh celic. Je oksidativni encim, ki v procesu glikolize katalizira pretvorbo laktata v piruvat in obratno. Ob poškodbi celične membrane se nemudoma sprosti v celično gojišče, kar izkorišča encimski test, s katerim določamo mrtve celice. Test je dvostopenjski.



Slika 2: Shematični prikaz kvantitativnega testa LDH (prirejeno po: Wang in sod., 2012: 100)

V prvem koraku pride do oksidacije laktata v piruvat, pri čemer se NAD^+ reducira v NADH/H^+ . V drugem koraku katalizator (encim diaforaza) prenese H/H^+ iz NADH/H^+ na tetrazolijevo sol, ki se reducira v rdeče obarvan formazan, katerega količina, ki je sorazmerna količini NAD , spektrofotometrično določimo (Decker in Lohmann-Matthes, 1988).

2.2.2 Testiranje citotoksičnosti s sistemom direktnega kontakta

Pri sistemu direktnega kontakta vzpostavimo neposreden stik med biomaterialom in celično kulturo. Za razliko od sistema ekstrakcije, kjer so vse celice izpostavljene enaki koncentraciji potencialno toksične snovi, gre tu za upadanje koncentracije glede na oddaljenost celic od materiala. Sistem direktnega kontakta nam poda informacije o rasti in morfologiji celic, z morebitnim nastankom cone inhibicije pa določimo stopnjo citotoksičnosti (Murray in sod., 2007).

2.3 FENOL KOT POZITIVNA KONTROLA

Fenoli in njihovi derivati so običajno prisotni v okolju, saj se fenolne spojine uporabljajo kot komponente barv, polimerov, zdravil in drugih organskih substanc. Prisotnost fenolov v okolju je torej povezana z industrijo, s produkcijo in razgradnjo pesticidov ter s komunalnimi odpadki. Nekateri fenoli nastajajo tekom naravnih procesov (sinteza kloriranih fenolov v glivah in rastlinah), vendar so ne glede na izvor vsi fenoli potencialno toksični (Michalowicz in Duda, 2007). Ključen faktor, ki določa citotoksičen vpliv fenola, je reaktivnost fenola z biomolekulami in enostavnost doniranja prostega elektrona iz oksidirane substrata. Oksidacijo v celicah katalizirajo oksidativni encimi, kot je peroksidaza v jetrih, pljučih in drugih organih, ter prostaglandini in mieloperoksidaze v kostnem mozgu. Pri teh reakcijah nastanejo fenolni radikal in intermediarni metaboliti, ki interagirajo z biomolekulami v celici. Vzporedno nastajajo reaktivne kisikove zvrsti (ROS) in reaktivne dušikove zvrsti (NOS). Posledica delovanja ROS in NOS so poškodbe mitohondrijev in celičnih membran, kar vodi v povečano permeabilnost membran, vdor Ca^{2+} ionov in nabrekanja celice (Michalowicz in Duda, 2007). Povečana koncentracija ROS vodi v nastanek vnetja, mutagenezo, karcinogenezo in razvoja nekaterih avtoimunskih bolezni (Michalowicz in Duda, 2007).

Ko ksenobiotik vstopi v celico, pride do biotransformacije, navadno z oksigenazo citokrom P450, pri čemer celica ksenobiotik najprej spremeni v vodotopno molekulo. Sledi faza konjugacije. Nastali elektrofilni metaboliti so v tej točki dovolj reaktivni, da reagirajo z DNA in podobnimi molekulami, zato jih N-acetil ali glutathion-S-transferaza zaestrijo z dodajanjem velikih anionskih skupin (npr. GSH). V zadnji fazi lahko potečejo še dodatne modifikacije konjugantov in celica vodotopne produkte preko krvi in ledvic izloči iz telesa. Če je koncentracija ksenobiotika velika, proces biotransformacije ni popolnoma učinkovit, elektrofilni metaboliti se vežejo na DNA in jo tako poškodujejo.

Fenol smo izbrali kot pozitivno kontrolo citotoksičnosti zaradi učinkovitega in ponovljivega neselektivnega citotoksičnega učinka, poleg tega ga tudi standard ISO 10993 predlaga kot najbolj primerno pozitivno kontrolo.

2.4 CELIČNE KULTURE

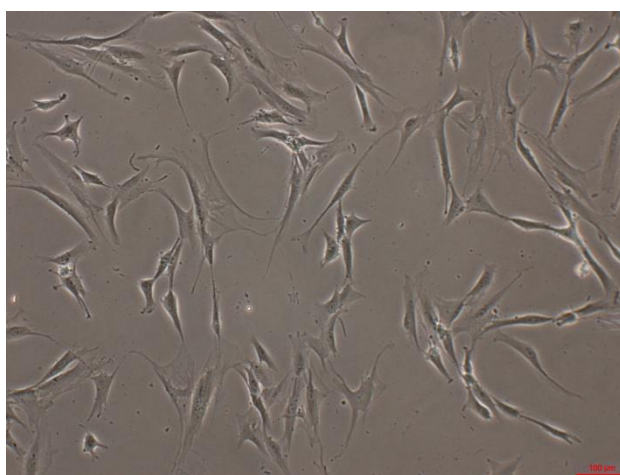
2.4.1 Primarna celična kultura

Primarno celično kulturo predstavljajo celice, gojene neposredno po osamitvi iz tkiva. Prvotno je primarna celična kultura heterogena, kasneje jo v odsotnosti selekcijskih pogojev (npr. sestava gojišča) pogosto prerastejo fibroblasti ali žilne celice. Zato razvoj želenega specifičnega celičnega tipa stimuliramo s specifičnimi gojišči. Priprava primarne kulture je zahtevna in ohranitev *in vitro* je časovno omejena, a v tem času celice ohranijo diferenciacijske karakteristike izvornega tkiva. Z vsakim presajanjem primarne celične kulture namreč izgubljajo svoje specifične celične funkcije in so čedalje bolj podobne fibroblastom. Primarna celična kultura ima zato omejeno število pasaj. Celice primarne celične kulture se omejeno delijo. Celična proliferacija je omejena s kontaktno inhibicijo. Ko je rastno gojišče preraščeno in so celice v kontaktu ena z drugo, je dosežena konfluenca in kontaktno občutljive celice se prenehajo deliti. Morfologija celične kulture je odvisna od celičnega izvora: celice tekočih tkiv v celični kulturi rastejo v suspenziji, celice drugih tkiv pa se pritrjajo na podlago in tvorijo monosloj. Celične kulture veljajo za primarne, dokler imajo svojo celično funkcijo. Po tem dobimo sekundarne celične kulture oziroma celične linije.

2.4.1.1 Osteogena celična kultura

OSTEOBLASTI

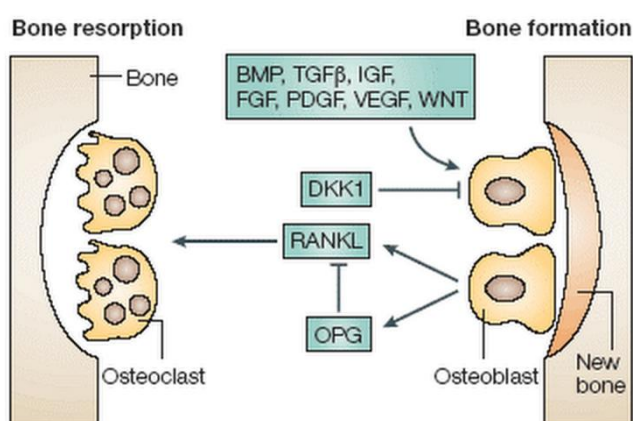
Osteoblasti so eden izmed treh celičnih tipov, ki tvorijo kostno tkivo. So enojedrne celice, ki se diferencirajo iz mezenhimskih matičnih celic (MSC, angl. *mesenchymal stem cells*).



Slika 3: Osteoblasti - 72 h po nasaditvi v 25 cm² gojilno posodo

Osteoblasti so odgovorni za sintezo novega kostnega tkiva na mestih, kjer je predhodno potekala resorpcija kostnine. Slednjo vršijo velike, večjedrne celice imenovane osteoklasti (Parikka in sod., 2005). Proces formacije in resorpcije skupaj imenujemo kostna premena (Ducy in sod., 2000). Premena, ki v kostnem tkivu poteka nenehno in je nujna za ohranjanje oblike in trdnosti kosti ter homeostaze kalcija, je strogo uravnana s strani celic in izvenceličnega matriksa (Heino in sod., 2004). Proces resorpcije je mnogo hitrejši od formacije: del kosti, ki se lahko resorbira v 2-3 tednih, za izgradnjo potrebuje vsaj 3 mesece (Harada in Rodan, 2003). Proces formacije in resorpcije sta tesno povezana. Vsakokrat po resorpciji na teh delih kosti pride do formacije kostnine, kar je posledica sproščanja rastnih faktorjev iz kosti tekom resorpcije (Gori in sod., 2000). Poleg sinteze kostnine, je naloga osteoblastov tudi uravnavanje stopnje resorpcije. Preko izločanja liganda (RANKL), ki se veže na receptor (RANK) na površini pre-osteoklastne celice in povzroči diferenciacijo v osteoklaste resorpcijo povečujejo, zmanjšujejo pa jo z izločanjem receptorja OPG, ki se veže z RANKL, s čimer se prepreči interakcija RANK/RANKL in diferenciacija pre-osteoklastov (Gori in sod., 2000). Po končanem procesu formacije se osteoblasti, obdani s kostnino, spremenijo v osteocite, postanejo inaktivni osteoblasti ali podležejo apoptozi (Manolagas, 2000; Jilka in sod., 1998). Pod posebnimi pogoji se lahko diferencirajo v celice, ki producirajo hrustancu podobno kost (Li in sod., 2004). Kateremu procesu sledijo, je odvisno od starosti, tipa kosti, hormonskega in morebitnega bolezenskega stanja (Jilka in sod., 1998).

Tesna povezanost procesov formacije in resorpcije je ključnega pomena pri implantacijah kostnih vsadkov, vendar je dolgoročno lahko problem lokacija osteoblastov in osteoklastov. Ti so si zelo blizu skupaj in toksični produkti, ki bi potencialno lahko nastali pri razgrajevanju biomateriala, bi negativno vplivali tako na osteoblaste kot tudi na osteoklaste, pri čemer bi se proces premene prekinil.

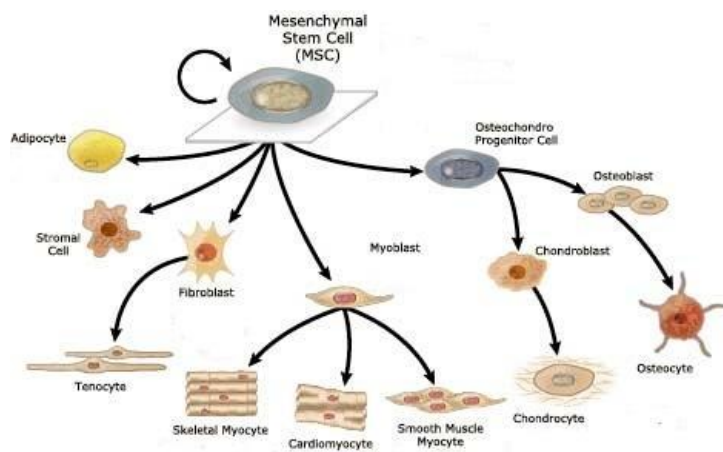


Slika 4: Kostna premena (Logotheris in Lin, 2005: 1)

Naloge osteoblastov so torej sinteza kostnine, uravnavanje stopnje resorpcije kostnine in vzdrževanje skeletne arhitekture, zaradi česar igrajo ključno vlogo v patofiziologiji osteoporoze in pri celjenju kostnih poškodb (Mackie, 2003).

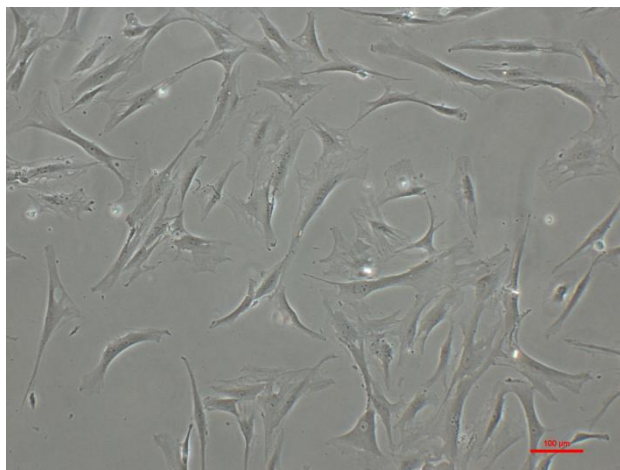
MSC

Kostno tkivo se neprestano razgrajuje, izgublja in nadomešča z novo kostnino. Za sintezo nove kosti so potrebne mezenhimske matične celice (MSC). MSC so multipotentne matične celice, ki imajo veliko možnost proliferacije in diferenciacije v številne celične tipe (Fang in Hall, 1997). Prve MSC so izolirali iz kostnega mozga, kasneje pa so dokazali možnost izolacije tudi iz ostalih vezivnih tkiv odraslih osebkov (Pountos in sod., 2006).



Slika 5: Diferenciacija mezenhimskih matičnih celic (prirejeno po: Mesenchymal stem cells – the human body pharmacy)

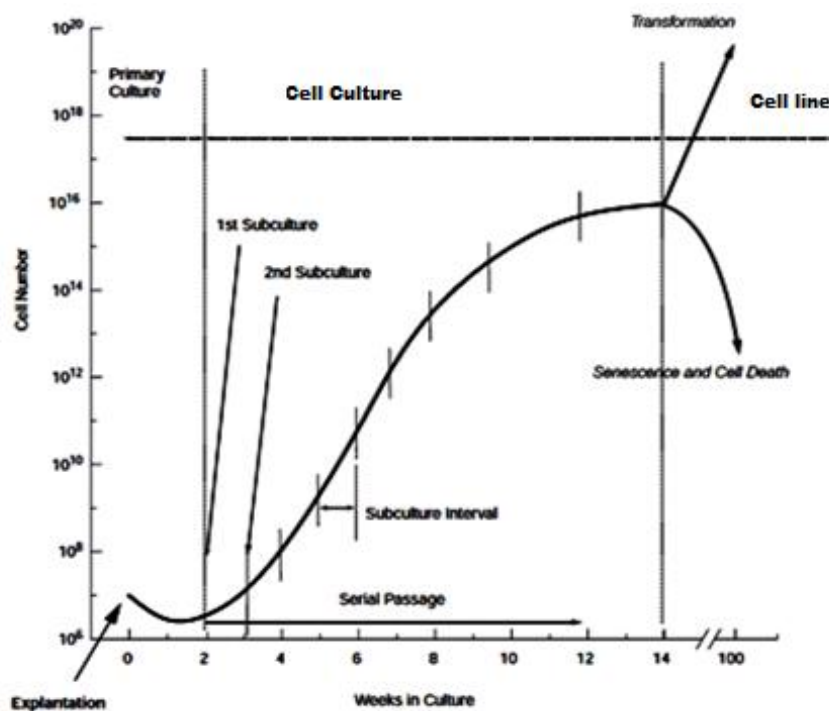
V *in vitro* pogojih se MSC pritrjajo na podlago, proliferirajo in izkazujejo fibroblastnim celicam podobno morfologijo (Krampera, 2006). Zaradi lastnosti kot so enostavna izolacija, ne-imunogenost (odsotnost imunogenosti), možnost alogenih transplantacij brez uporabe imunosupresivnih zdravil, sposobnost diferenciacije v specifični celični tip, stimulacija razmnoževanja celic in imunomodulatornosti imajo velik potencial v klinični uporabi (Karp in Leng, 2009). MSC so sposobne migracije in kot odgovor na poškodbe možganov, zlome kosti, poškodbe jeter in pljuč, akutne opekline ipd. MSC prehajajo na tarčno mesto ter sodelujejo pri popravilu in obnovi poškodovanega tkiva (Karp in Leng, 2009).



Slika 6: MSC - 72 h po nasaditvi v 25 cm² gojilno posodo

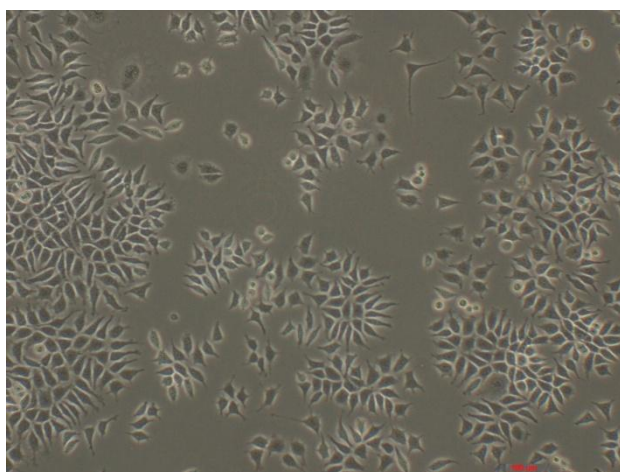
2.4.2 Celična linija

Po transformaciji ali mutaciji primarne celične kulture, ki povzroči nesmrtnost, dobimo celično linijo. Lahko pa primarna celična kultura ne preide v proces transformacije, temveč v senescenco in taka kultura propade. Celično linijo lahko presajamo neomejeno in s povečevanjem števila pasaž se populacija ne spreminja več, saj so najhitreje deleče se nesmrtnne celice prerasle ostale. Primarna celična kultura se s povečevanjem števila pasaž stara in izgublja funkcijo, celična linija pa ni podvržena senescenci, se neomejeno deli, se ne stara in ima vedno enako funkcijo, kar je glavna razlika med celično kulturo in linijo. Celična linija tudi ni občutljiva na kontaktno inhibicijo in celice celične linije po dosegu konfluente povsem prerastejo gojišče. Čeprav lahko s preraščanjem primarne kulture z enim celičnim tipom pride do pridobitve uporabnih celičnih linij, med njimi tudi mišjih podkožnih fibroblastov (L-celic), prav to predstavlja enega večjih izzivov pri pridobivanju občutljivejših in počasneje rastočih specializiranih celic.



Slika 7: Tipi celičnih kultur (prirejeno po: Freshney R. I., 2011)

Celično linijo okarakteriziramo s hitrostjo rasti, številom pasaž (številom subkultiviranja) in generacijskim številom (številom podvojitvev).



Slika 8: L929 - 4.dan po nasaditvi v 25 cm² gojilno posodo

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Celice:

Celična kultura	Pasaža	Proizvajalec (vir)
Celična linija mišjih fibroblastov L929	11-26	Sigma Aldrich, ZDA
Primarna kultura humanih osteoblastov	4-6	Ortopedska klinika, Ljubljana
Primarna celična kultura mezenhimskih matičnih celic	6-7	Ortopedska klinika, Ljubljana

Reagenti:

Ime	Okrajšava	Proizvajalec
Dulbeccov fosfatni pufer	DPBS	Gibco, ZDA
Dulbeccova modifikacija Eaglovega medija	DMEM/F-12	Gibco, ZDA
Dulbeccova modifikacija Eaglovega medija	Advanced DMEM	Gibco, ZDA
Fetalni goveji serum	FBS	Invitrogen, ZDA in PAA, Avstrija
Glutamax		Invitrogen, ZDA
Bazični fibroblastni rastni dejavnik	bFGF	
Raztopina tripsin/EDTA		Sigma Aldrich, ZDA
Gentamicin		Gibco, ZDA
Barvilo tripan modro		Sigma Aldrich, ZDA
Izopropanol		Sigma Aldrich, ZDA
Klorovodikova kislina		
Fluorescentno barvilo kalcein		Invitrogen, ZDA
Reagenti kompleta TOX-7		Sigma Aldrich, ZDA
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolni bromid	MTT	Sigma Aldrich, ZDA
Dimetil sulfoksid	DMSO	

Biomateriali in referenčni materiali:

Material	Okrajšava	Proizvajalec
Fenol		Sigma Aldrich, ZDA
Mateial A		interna negativna kontrola
Referenčni material B		Hatano Research Institute, Japonska
Material C		interna močno pozitivna kontrola
Referenčni material D		Hatano Research Institute, Japonska
Material E		realni vzorec biomateriala

Laboratorijski material:

Material	Proizvajalec
Gojilne posode (25 cm ² in 75 cm ²)	TPP, Švica
Gojilne plošče s 6 in 96 luknjicami	TPP, Švica
Tipsi (10, 100 in 1000 µl)	Eppendorf, Nemčija in BIOHIT, Švica
Pipete (2, 5, 10, 25 ml)	Corning, ZDA in TPP, Švica
Kapalke	Sarstedt, Nemčija
Centrifugirke (15 in 50 ml)	TPP, Švica
Mikrocentrifugirke	Applied Biosystems, ZDA
Viale	Corning, ZDA
Števne komore	Immune System, Velika Britanija
Brizge	
Membranski filtri Minisart	Sigma Aldrich, ZDA
Skaplel	Aesculap, ZDA
Pinceta	
Škarje	
Ravnilo	

Laboratorijska oprema:

Oprema	Proizvajalec
Avtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija in BIOHIT, Finska
Multikanalna pipeta	Eppendorf, Nemčija
Pipetor za pipete (Pipetboy)	INTEGRA Bioscience, Švica
Inkubatorji z vlažno atmosfero, 37 °C in 5 % CO ₂ ,	
Zaščitne mikrobiološke komore	
Centrifuga	Eppendorf, Nemčija
Grelni blok	
Vodna kopel	
Tehtnica	
Svetlobni mikroskop	Nikon, Japonska
Lupa	Nikon, Japonska
Spektrofotometer	Hidex Chamelleon, Italija
Posoda za počasno zamrzovanje (MrFrosty)	

Gojišča in raztopine:

Gojišča in raztopine	Sestava
10 % serumsko gojišče za L929	<ul style="list-style-type: none">• DMEM/F-12• 10 % FBS (PAA, Avstrija)• 0,1 % gentamicin
10 % serumsko gojišče za humane celice	<ul style="list-style-type: none">• Advanced DMEM• 10 % FBS (Invitrogen, ZDA)• 2 % glutamax• 0,1 % gentamicin• 0,1 % bFGF s koncentracijo 1 µg/ml *
Brezserumsko gojišče za L929	<ul style="list-style-type: none">• DMEM/F-12• 0,1 % gentamicin
Brezserumsko gojišče za humane celice	<ul style="list-style-type: none">• Advanced DMEM• 2 % glutamax• 0,1 % gentamicin
Kisel izopropanol	<ul style="list-style-type: none">• Izopropanol• 4 % 0,04 M HCl

*dodamo le v primeru gojenja celic in ne za izvajanje testov citotoksičnosti

3.2 METODE DELA

Za delo s celicami morajo biti zagotovljeni aseptični pogoji, zato smo delo opravljali v zaščitnih mikrobioloških komorah z laminarnim pretokom zraka. Komoro smo pred začetkom dela pustili delovati vsaj 15 minut in nato s 70 % etanolom očistili notranje površine. Vsa oprema in material, vnesena v komoro, sta bila predhodno sterilizirana, pakirana in površinsko očiščena s 70 % etanolom.

3.2.1 Gojenje celic

Celice smo gojili v 10 % serumskem gojišču v inkubatorjih s 100 % vlažnostjo, temperaturo 37 °C in atmosfero s 5 % CO₂. Vsi reagenti, ki so prišli v stik s celicami, so bili sterilni, poleg tega pa smo jih, razen raztopine tripsin/EDTA in kompletov reagentov, predhodno segreti v grelnem bloku na 37 °C.

3.2.2 Odmrzovanje in zamrzovanje celic

Celične kulture se shranjujejo v vialah pri -180 °C v tekočem dušiku. Celice so shranjene v 10 % raztopini dimetil sulfoksida (DMSO), ki je kriorotektant, vendar je citotoksičen, zato mora biti postopek odmrzovanja čim hitrejši. Vialo s celicami smo vzeli iz tekočega dušika in jo takoj začeli segreti na 37 °C. Ko se je približno polovica celične suspenzije odtalila, smo

po kapljicah dodajali 10 % serumsko gojišče, da bi čim hitreje razredčili in s tem zmanjšali toksične vplive DMSO ter hkrati preprečili ozmotski šok celic v raztopini. Suspenzijo smo sproti prenašali v 15 ml centrifugirko. Centrifugirali smo 5 minut pri 300 RCF, odlili supernatant in celice resuspendirali v 10 % serumskem gojišču, pri čemer je bil volumen odvisen od števila celic. Celice smo prešteli pod mikroskopom s pomočjo števne komore, kot je opisano v poglavju 3.2.3. Celice smo v ustrezni gostoti nasadili v gojilne posode in jih gojili v inkubatorju. Pri zamrzovanju smo suspenzijo celic centrifugirali 5 minut pri 300 RCF, supernatant odlili, celice s stresanjem resuspendirali in nato med stalnim stresanjem po kapljicah dodali 1 ml zamrzovalnega medija (10 % DMSO v serumu). Mešanico smo odpipetirali v vnaprej označeno vialo, vialo prenesli v posodo za zamrzovanje celic MrFrosty in jo postavili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. To omogoča optimalno hitrost ohlajanja $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, saj mora biti hitrost zamrzovanja (za razliko od odmrzovanja) počasna in kontrolirana. Vialo s celicami smo po 24 urah iz posode MrFrosty prenesli v tekoči dušik.

3.2.3 Štetje celic

Celice smo razredčili do gostote, primerne za štetje, kar je bilo v našem primeru približno 200000 celic/ml. Šteli smo v štirih tehničnih ponovitvah. Vsaki 20 μl kapljici barvila tripan modro smo dodali enak volumen celične suspenzije, s pipeto dobro premešali in 10 μl od vsake ponovitve prenesli na števno komoro. Pod mikroskopom smo prešteli žive in mrtve celice, nato pa izračunali število živih celic v celotnem vzorcu po enačbi:

$$N = \frac{n_1 + n_2 + n_3 + n_4}{40} * R * V * 10^4 \quad \dots(1)$$

N – število živih celic

n – število živih celic v vsaki izmed štirih tehničnih ponovitev

R – faktor redčenja zaradi mešanja z barvilom tripan modro

V – volumen izhodne celične suspenzije

Celično suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 300 RCF, takoj za tem odlili supernatant in celice resuspendirali v DMEM do gostote 10^6 celic/ml.

3.2.4 Tripsinizacija

3.2.4.1 Celice L929 v gojilni posodi s površino 25 cm^2

Celice smo previdno sprali z dvakrat po 4 ml pufra DPBS. Celicam smo dodali 2 ml raztopine tripsin/EDTA in inkubirali 3 minute v inkubatorju. Če se po tem času celice niso odlepile od podlage, smo posodo s celicami rahlo potresli, nato pa v čim krajšem času dodali 4 ml 20 % seruma PAA v starem gojišču. S tem smo inaktivirali delovanje tripsina. Celično suspenzijo smo prenesli v 50 ml centrifugirko, sprali gojilno posodo z dvakrat po 4 ml DMEM, s kapalko

dobro resuspendirali in nato še redčili z DMEM do želenega volumna. Celice smo prešteli s pomočjo števne komore, kot je opisano v poglavju 3.2.3.

3.2.4.2 Primarne celične kulture v gojilni posodi s površino 25 cm²

Celične kulture osteoblastov in MSC smo tripsinizirali po enakem postopku kot celične linije, le da smo namesto seruma PAA uporabili FBS, za spiranje gojilne posode in redčenje pa 10 % serumsko gojišče.

3.3 TESTI CITOTOKSIČNOSTI S SISTEMOM EKSTRAKCIJE

Vsakega od testov citotoksičnosti smo izvedli v štirih časovnih točkah s štirimi različnimi koncentracijami fenola in v treh tehničnih ponovitvah, kot je prikazano na sliki 9.

Čas Koncen- tracija fenola	2 h			24 h			48 h			6 dni		
0,5 %	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,05 %	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,005 %	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0 %	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Slika 9: Shema koncentracijskega in časovnega poteka testov sistema z ekstrakcijo

Za vsakega od testov (test barvanja s tripan modrim, test s kalceinom in test MTT) smo potrebovali 48 luknjic, za test LDH pa 96 luknjic.

Celice smo nasadili v gojilne plošče s 96 luknjicami z gostoto 5000 celic/cm² (za test LDH z gostoto 10000 celic/cm²) v 10 % serumskem gojišču. Volumen gojišča v vsaki luknjici je bil 100 µl. Celice smo čez noč pustili v inkubatorju, da so se pritrdile na podlago. Naslednji dan smo v ustreznih koncentracijah dodali fenol in nato v določenih časovnih intervalih izvajali teste. Četrty dan smo zaradi časovno omejene stabilnosti komponent gojišča celicam časovne točke 6 dni zamenjali gojišče z dodatkom fenola ustrezne koncentracije. Kot pozitivna kontrola nam je služilo gojišče z 0,5 % koncentracijo fenola, k negativni kontroli pa fenola nismo dodali.

Za teste s sistemom ekstrakcije smo uporabljali celice celične linije L929 (podjetja Sigma Aldrich) kot primarni celični kulturi pa osteoblaste in MSC, pridobljene na Ortopedski kliniki Ljubljana.

3.3.1 Test s kalceinom

Test merjenja fluorescence kalceina smo izvajali v temi. Iz luknjic smo odstranili gojišče in v vsako luknjico dodali po 100 μ l DPBS + kalcein s koncentracijo 0,5 μ l/ml. Celice smo inkubirali v temi pri 37 °C in po 45 minutah s spektrofotometrom s filtroma 490 nm in 520 nm izmerili fluorescenco kalceina. Od dobljenih izmerjenih fluorescenc smo najprej odšteli povprečje treh tehničnih ponovitev pozitivne kontrole (0,5 % koncentracija fenola). Odstotek fluorescence smo nato izračunali tako, da smo za vsakega od treh izvedenih tedenskih poskusov iz podatkov treh tehničnih ponovitev izračunali povprečja in standardne odklone, nato izračunali povprečja in odklone dveh poskusov ter iz dobljenih vrednosti še povprečja in odklone združeno s tretjim poskusom. Dobljene vrednosti smo normalizirali na vrednosti povprečja izmerjenih fluorescenc treh tehničnih ponovitev negativne kontrole in jih izrazili kot odstotek.

3.3.2 Test MTT

Iz luknjic smo odstranili gojišče in v vsako dodali po 100 μ l mešanice 10 % serumskega gojišča in 1/10 volumna MTT s koncentracijo 5 mg/ml. Celice smo inkubirali v inkubatorju preko noči. Naslednji dan smo odpipetirali in zavrgli gojišče z MTT-jem in v vsako luknjico dodali po 100 μ l kislega izopropanola, ki raztopi kristale formazana. Ploščo smo centrifugirali 7 minut pri 2250 RCF. Nato smo iz vsake luknjice po 50 μ l supernatanta prenesli v svežo ploščo s 96 luknjicami in s spektrofotometrom izmerili absorbanco formazana pri valovni dolžini 570 nm in nespecifično absorbanco okolja pri 660 nm.

Za vsakega od treh izvedenih tedenskih poskusov smo iz podatkov treh tehničnih ponovitev izračunali povprečje in standardni odklon ter nato izračunali povprečja in odklone dveh poskusov ter nato iz dobljenih vrednosti še povprečja in odklone združeno s tretjim poskusom. Vrednosti smo normalizirali na povprečje aktivnosti encima SDH treh tehničnih ponovitev negativne kontrole (0 % koncentracija fenola) in jih izrazili kot odstotek.

3.3.3 Barvane s tripan modrim

Celice smo obarvali z barvilom tripan modro tako, da smo ploščo najprej centrifugirali 5 minut pri 2250 RCF, da bi se tudi morebitne mrtve in že od podlage odlepljene celice posedle na dno in bi jih tako lahko upoštevali pri štetju. Po centrifugiranju smo odstranili gojišče in v

vsako luknjico dodali po 40 μ l mešanice DMEM + tripan modro v razmerju 2:1. Sproti smo iz vsake luknjice odstranjevali barvilo in s pomočjo mikroskopa šteli žive in mrtve celice. V vsaki luknjici smo prešteli celice na 2 vidnih poljih.

Iz povprečja števila celic teh dveh vidnih polj smo glede na površino vidnega polja izračunali število celic na površini celotne luknjice. Za vsakega od treh izvedenih tedenskih poskusov smo iz podatkov treh tehničnih ponovitev izračunali povprečje in standardni odklon, nato izračunali povprečja in odklone dveh poskusov ter nato iz dobljenih vrednosti še povprečja in odklone združeno s tretjim poskusom. Vrednosti smo normalizirali na povprečje števila živih celic treh tehničnih ponovitev.

3.3.4 Test LDH

Merjenje aktivnosti LDH smo izvedli po navodilih proizvajalca. Izvedba testa poteka v dveh vzporednih metodah. S prvo metodo se meri celokupen LDH (žive in mrtve celice), v drugi pa le LDH sproščen iz celic v gojišče (mrtve celice). S kombinacijo obeh metod torej lahko poleg mrtvih določimo tudi žive celice.

Najprej smo izvedli prvo metodo, pri čemer smo v vsako luknjico dodali po 10 μ l pufru za lizo celic (LDH Assay Lysis Solution) in celice inkubirali 45 minut v inkubatorju. Nato smo celice 4 minute centrifugirali pri 250 RCF. Medtem smo pripravili mešanico za encimsko analizo. Reagente iz kompleta (LDH Assay Substrate Solution, LDH Dye Solution in LDH Assay Cofactor Preparation) smo zmešali v razmerju 1:1:1. V svežo ploščico s 96 luknjicami smo odpipetirali po 50 μ l mešanice na luknjico in po končanem centrifugiranju v vsako luknjico dodali po 25 μ l supernatanta iz vsake luknjice na plošči, ki je bila centrifugirana. Sledila je 30 minutna inkubacija v temi na sobni temperaturi. Za tem smo reakcijo ustavili z dodatkom 1/10 volumna 1 M HCl in s spektrofotometrom izmerili absorbance produkta pri valovni dolžini 490 in nespecifično absorbance okolja pri 660 nm. Ti rezultati so predstavljali količino LDH živih in mrtvih celic.

Za podatek o iz celic sproščenem encimu, smo izvedli drugi del testa LDH, pri čemer smo gojilno ploščico najprej 4 minute centrifugirali pri 250 RCF. Medtem smo v novo ploščico odpipetirali po 50 μ l prej pripravljene mešanice za encimsko analizo, kamor smo po končanem centrifugiranju dodali po 25 μ l supernatanta. Sledila sta inkubacija in zaustavitev reakcije, nato pa merjenje absorbance na enak način kot za izvedbo prve metode.

Delež živih celic smo izračunali z odštevanjem absorbance prve metode z absorbance druge metode, pri čemer smo kot 100 % živost upoštevali povprečje absorbance treh tehničnih ponovitev negativne kontrole (0 % koncentracije fenola). Enako normiranje smo uporabili za izračun deleža mrtvih celic, pri čemer smo upoštevali absorbance izmerjene pri drugi metodi. Test LDH smo izvedli le enkrat in zato izračunali le standardne odklone, ne pa tudi povprečij tehničnih ponovitev.

3.4 TEST CITOTOKSIČNOSTI S SISTEMOM DIREKTNEGA KONTAKTA

Sistem direktnega kontakta smo izvedli s celičnimi linijami L929 in z MSC. Uporabili smo 5 različnih biomaterialov in sicer dva validirana (A in C), dva certificirana (B in D) in en neznan material (E). Validirana materiala sta nam služila kot negativna (A) in močna pozitivna kontrola (C), certificirana pa kot šibka pozitivna (B) in močna pozitivna kontrola (D).

V prvi stopnji je potrebno materiale pritrditi na dno gojilne posode. V ta namen smo odrezali koščke referenčnih materialov velikosti 0,5 x 0,5 cm in jih z negativno kontrolo fiksirali na dno gojilne ploščice s 6 luknjami. Z materiali smo rokovali s pomočjo pincete in pazili, da je fiksiranje potekalo hitro in z ne preveč odvečnega materiala, saj bi odvečni material, ki bi gledal izpod materiala, lahko dal lažne rezultate. Material A smo nanесли direktno na dno gojilne posode v približno enaki velikosti kot certificirana materiala. Material C smo v volumnu 5 μl nanесли s pipeto. Ko so bili materiali dobro pritrjeni, smo po vsej površini gojilne posode nasadili celice z gostoto 5000 celic/ cm^2 za celično linijo in 7500 celic/ cm^2 za MSC. Volumen gojišča v vsaki luknjici je znašal 2 ml oziroma toliko, da je bil material popolnoma prekrit.

Rast celic smo spremljali 7 dni z dnevnim opazovanjem in slikanjem z mikroskopom pod 100-kratno povečavo. 7. dan smo celice pobarvali z MTT. V vsako luknjo smo dodali 1/10 volumna barvila MTT s koncentracijo 5 mg/ml in inkubirali čez noč v inkubatorju. Naslednji dan smo celice slikali makroskopsko s fotoaparatom in z lupo, najprej z gojiščem z barvilom, nato pa še z odstranjenim gojiščem.

4 REZULTATI

4.1 CITOTOKSIČNOST S SISTEMOM EKSTRAKCIJE

Z našo raziskavo smo skušali ugotoviti, kako se metode, ki se uporabljajo za določevanje citotoksičnosti, med seboj razlikujejo ter kakšen citotoksičen vpliv imajo izbrane substance na primarne celične kulture in celične linije. Pridobljene rezultate smo prikazali v dveh različnih grafičnih prikazih. Z grafom deleža celic v odvisnosti od časa je bolj razvidna razlika med metodami, grafi deleža celic v odvisnosti od koncentracije fenola pa ponazarjajo dobljene razlike med celičnimi kulturami. V prikazanih rezultatih so združeni dobljeni rezultati treh tedenskih poskusov s po tremi tehničnimi ponovitvami.

4.1.1 Primerjava metod ugotavljanja citotoksičnosti

4.1.1.1 Testiranje na L929

Na celični liniji L929 smo v treh tehničnih ponovitvah izvedli test s kalceinom, test MTT, barvanje s tripan modrim in test LDH. Test LDH je bil izveden enkrat, zato iz rezultatov nismo izračunali povprečja in so prikazani rezultati vseh treh tehničnih ponovitev vsake izmed koncentracij fenola. Ostale teste smo izvedli po trikrat ter izračunali povprečje in standardni odklon.

Pri testu s kalceinom se učinek fenola vidi že po 2 urah inkubacije. Do upada v koncentraciji fluorescence je prišlo pri vseh koncentracijah fenola, tudi pri najnižji (Slika 10-1).

Po 24 urah je fluorescenca še močneje upadla pri višjih dveh koncentracijah (0,05 in 0,5 %), pri 0,005 % koncentraciji pa je ostala nespremenjena in je 48 ur kasneje celo narasla. Vendar pa po 6-dnevni inkubaciji opazimo približno enake vrednosti odstotkov fluorescence kot po 2 urah (Slika 10-1).

Pri testu MTT opazimo pri pozitivni kontroli močan upad aktivnosti encima že po 2 urah, odstotki aktivnosti SDH pri srednjih dveh koncentracijah (0,005 in 0,05 %) sta enaki negativni kontroli (slika 10-2).

Po 24 urah opazimo podobno porast pri vseh koncentracijah z dodanim fenolom. Encimska aktivnost pri 0,005 % koncentraciji fenola je po tem času narasla nad aktivnost negativne kontrole. Pri vseh testiranih koncentracijah fenola pa vidimo, da je po 48 urah prišlo do zmanjšanja aktivnosti encima, ki je pri koncentraciji 0,05 in 0,5 % do 6. dne ostala skoraj nespremenjena, medtem, ko je pri koncentraciji 0,005 % do te časovne točke še upadala.

Pri testu barvanja s tripan modrim je vpliv najvišje koncentracije fenola (pozitivne kontrole) viden že po 2 urah, saj živih celic nismo več prešteli. Vendar je na grafu, ki prikazuje mrtve celice, delež le-teh po 2 urah pri najvišji koncentraciji fenola le 20 % (sliki 10-3A in 3B).

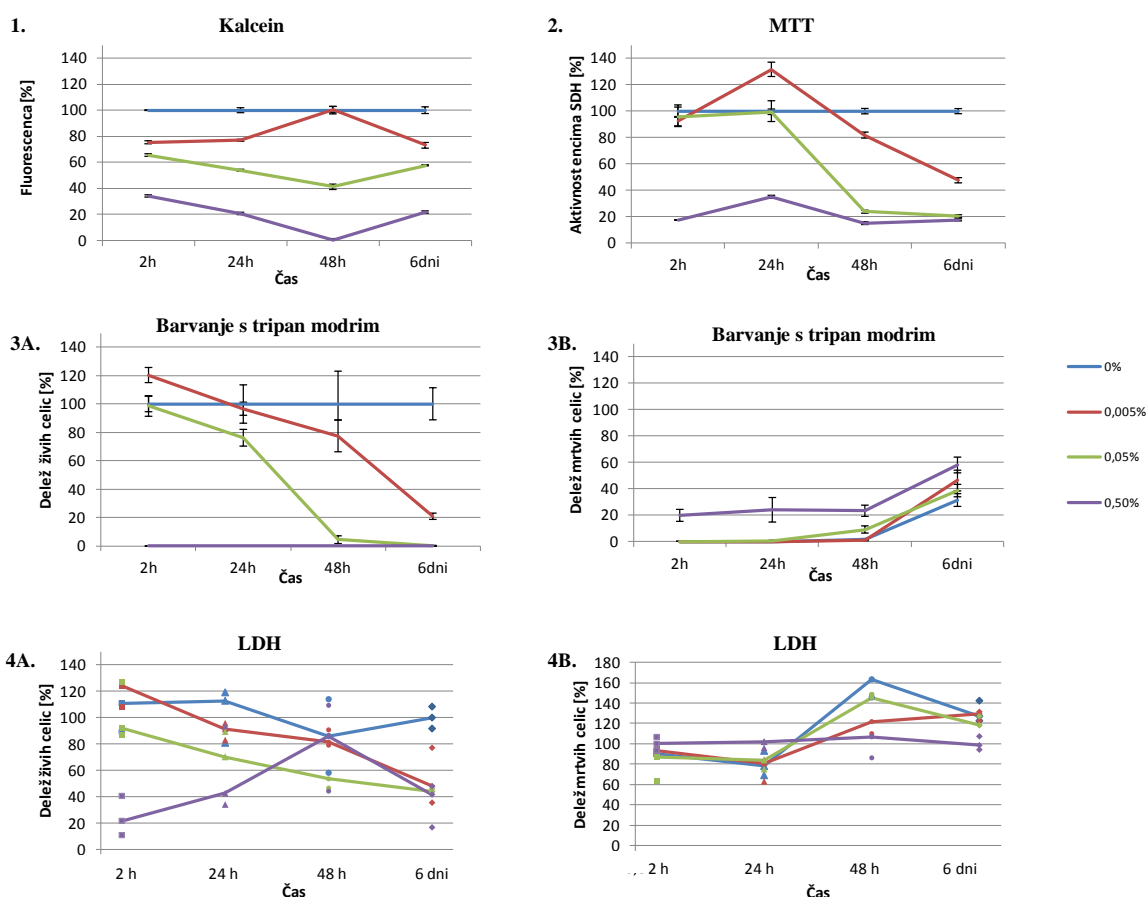
Pri vmesnih koncentracijah je prišlo do postopnega upada živih celic od 24 ur do 6 dni testiranja.

V primerjavi s tem iz grafa deleža mrtvih celic opazimo postopen porast števila mrtvih celic pri srednjih koncentracijah fenola med 24 urami in 6 dnevi, vendar razlika med koncentracijami ni signifikantna (slika 10-3B).

Iz grafov testa LDH lahko vidimo, da je že po 48 urah, predvsem pa po 6 dneh prišlo do velikega zmanjšanja živih celic negativne kontrole (slika 10-4A).

Pri 2 urah je delež živih celic pri koncentraciji 0,005 % višji od negativne kontrole. Od časa 2 ur do 48 ur je trend padanja živosti celic pri 0,005 in 0,05 % koncentraciji fenola primerljiv, kasneje pa delež živih celic pri koncentraciji 0,005 % hitreje pada. Odstotek živih celic pozitivne kontrole od 2 ur do 48 ur narašča, nato pade, a na višjo vrednost kot je vrednost živih celic iste koncentracije po 2 urah (slika 10-4A).

Takega trenda ne kažejo rezultati mrtvih celic, kjer se delež le-teh s časom skoraj ne spreminja. Delež mrtvih celic je po 2 urah, 24 urah in 6 dneh pri ostalih koncentracijah fenola (0 %, 0,005 % in 0,05 %) enak, do razlik je prišlo edino pri 48 urah, ko je največ mrtvih celic pri negativni kontroli (slika 10-4B).



Slika 10: Primerjava metod s sistemom ekstrakcije na celicah L929

Test je bil izveden v štirih časovnicah po dodatku fenola v različnih koncentracijah. Grafa testa LDH prikazujeta rezultate 3 tehničnih ponovitev, pri čemer so srednji izmed rezultatov med seboj povezani.

4.1.1.2 Testiranje na osteoblastih

Na osteoblastih smo prav tako izvedli vse štiri teste in sicer na enak način, kot smo to storili na celični liniji L929.

Na grafu odvisnosti odstotka fluorescence od časa pri pozitivni kontroli vidimo počasno linearno padanje odstotka fluorescence pri dveh višjih testiranih koncentracijah fenola. Pri najnižji koncentraciji fenola (0,005 %) je prišlo do rahlega povišanja fluorescence v primerjavi z negativno kontrolo po 2 urah inkubacije ter upada fluorescence po 24 urah inkubacije, ob kasnejših meritvah (po 48 urah in 6 dneh) pa se odstotek fluorescence ni več zmanjševal (slika 11-1).

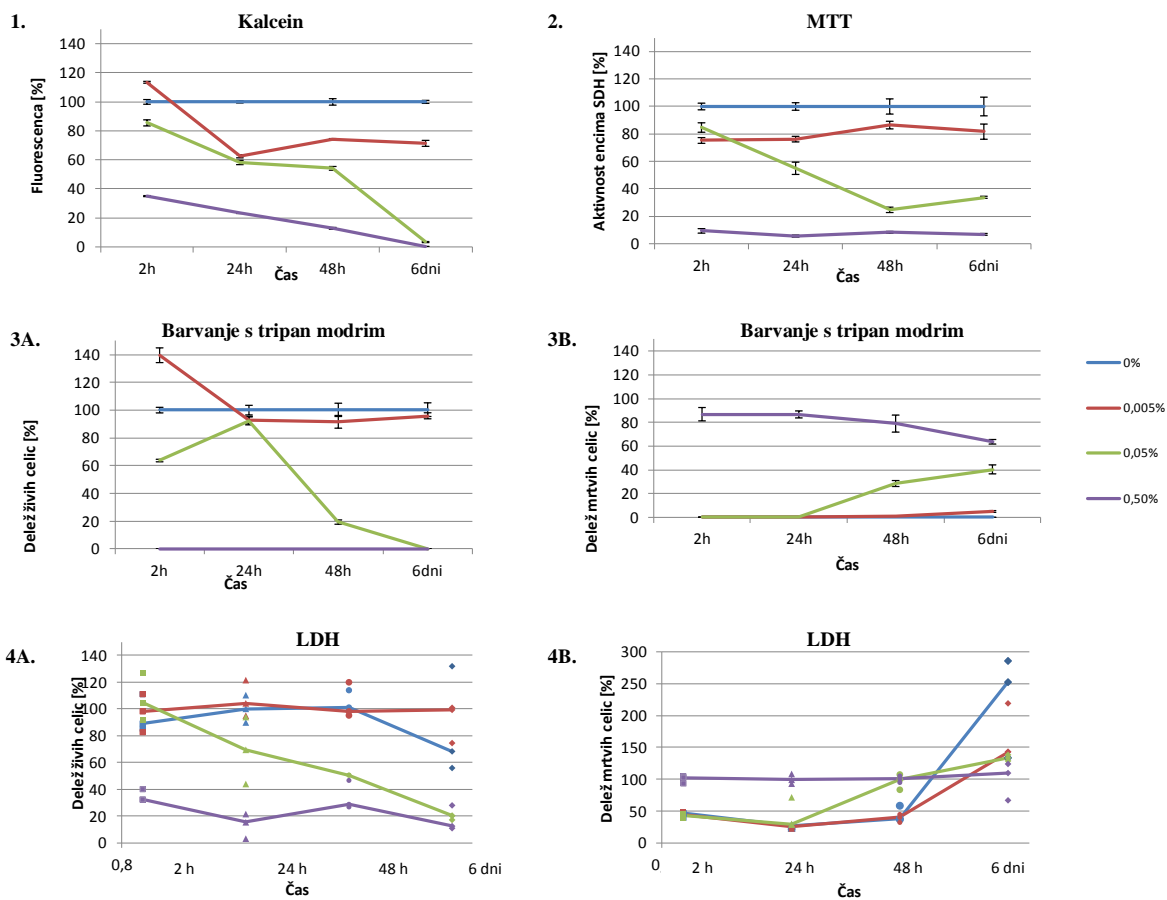
V nasprotju s tem smo pri testu MTT po 2 urah inkubacije pri 0,005% koncentraciji fenola zaznali zmanjšanje fluorescence v primerjavi z negativno kontrolo, ki pa se ni več spreminjal ob kasnejših meritvah. Pri srednji koncentraciji je prišlo do postopnega upada, pri najvišji pa smo že po 2 urah zaznali nizko aktivnost encima, ki se ob nadaljnjih meritvah ni spreminjala (slika 11-2).

Pri testu barvanja s tripan modrim smo pri 0,005 % koncentraciji fenola po 2 urah prešteli več živih celic kot po istem času v negativni kontroli. Delež teh je po 24 urah močno padel in bil ob tem času enak kot pri 0,05 % koncentraciji, pri kateri je delež živih celic od 2 ur do 24 ur narastel. Od 24 ur do 6 dni je pri koncentraciji 0,05 % delež živih celic močno upadal, medtem ko je pri 0,005 % koncentraciji ostal nespremenjen (slika 11-3A).

Na grafu, ki predstavlja mrtve celice opazimo, da s časom delež mrtvih celic pozitivne kontrole pada, kar pa se ne sklada z grafom, ki predstavlja žive celice. Ostali rezultati mrtvih celic se skladajo z rezultati živih (sliki 11-3A in 11-3B).

Iz rezultatov testa LDH vidimo, da so tudi celice v negativni kontroli po šestih dneh mrtve (slika 11-4B), kar je pri rezultatih z osteoblasti še bolj očitno kot pri celični liniji (slika 10-4). Takih rezultatov nismo dobili pri nobeni od ostalih metod.

Po 2 urah je delež živih celic pri koncentracijah 0,005 % in 0,05% skoraj enak negativni kontroli. Delež živih celic 0,005 % koncentracije se nato s časom ne spreminja, medtem ko le-ta pri koncentraciji 0,05 % hitro pada (slika 11-4A). Delež živih celic pozitivne kontrole je po 24 urah nižji kot po 2 urah, po 48 urah naraste in nato pri 6 dneh spet pade, kar ne sovпада z grafom deleža mrtvih celic (slika 11-4B). Rezultati deleža živih in mrtvih celic se ne skladajo tudi pri koncentraciji 0,005 %, kjer graf živih celic prikazuje s časom nespremenjeno živost, graf mrtvih pa od 2 ur do 48 ur kaže na manjši delež mrtvih celic.



Slika 11: Primerjava metod s sistemom ekstrakcije na osteoblastih

Test je bil izveden v štirih časovnicah po dodatku fenola v različnih koncentracijah. Grafa testa LDH prikazujeta rezultate 3 tehničnih ponovitev, pri čemer so srednji izmed rezultatov med seboj povezani.

4.1.1.3 Testiranje na MSC

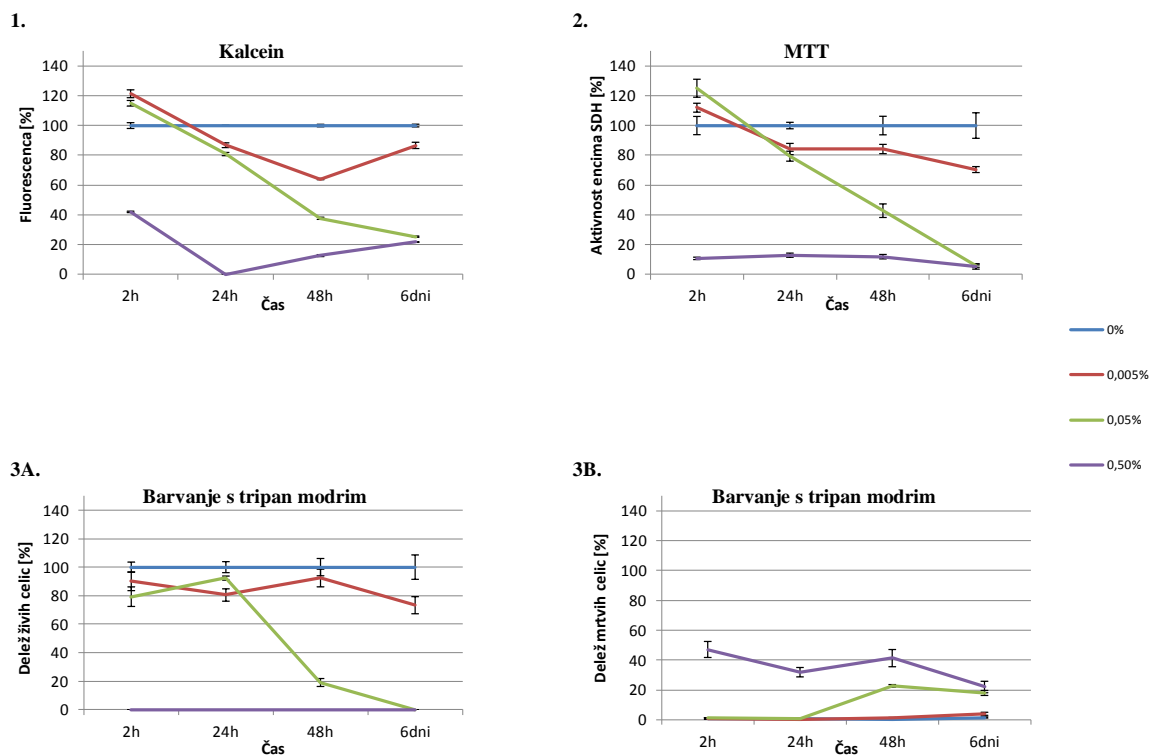
Na mezenhimskih matičnih celicah smo izvedli test s kalceinom, test MTT in barvanje s tripan modrim, ne pa tudi testa LDH. Teste smo izvedli na enak način kot na celični liniji L929 in osteoblastih.

Na grafu, ki prikazuje rezultate testa s kalceinom, je po 2 urah pri 0,005 % in 0,05 % koncentraciji fenola fluorescenca višja kot pri negativni kontroli, po 24 in 48 urah pa je prišlo do velikega upada deleža fluorescence, ki se je ustalil ali nekoliko narastel po 6 dneh merjenja. Pri najvišji koncentraciji fenola je odstotek fluorescence od 2 ur do 24 ur padel in nato od 24 ur do 6 dni deloma naraščal (slika 12-1).

Podoben odziv smo dobili pri testu MTT, le da se tu pri najnižji koncentraciji fenola po 48 urah aktivnost encima SDH ni zmanjšala, tako kot se je ob istem času in isti koncentraciji odstotek fluorescence (slika 12-2).

Iz grafov testa barvanja celic s tripan modrim je razvidno, da je do signifikantnih razlik med 0,005 % in 0,05 % koncentracijo fenola prišlo šele po 48 urah, medtem, ko se pred tem (2 uri in 24 ur) deleži živih in mrtvih celic le malo razlikujejo (slika 12-3).

Graf mrtvih celic prikazuje pri koncentraciji 0,05 % med 48 urami in 6 dnevi prikazuje le majhen porast v odstotku mrtvih celic, medtem, ko pri grafu živih celic vidimo, da delež živih celic hitro pada. Tudi rezultati pozitivne kontrole se med tema dvema grafoma ne ujemata.

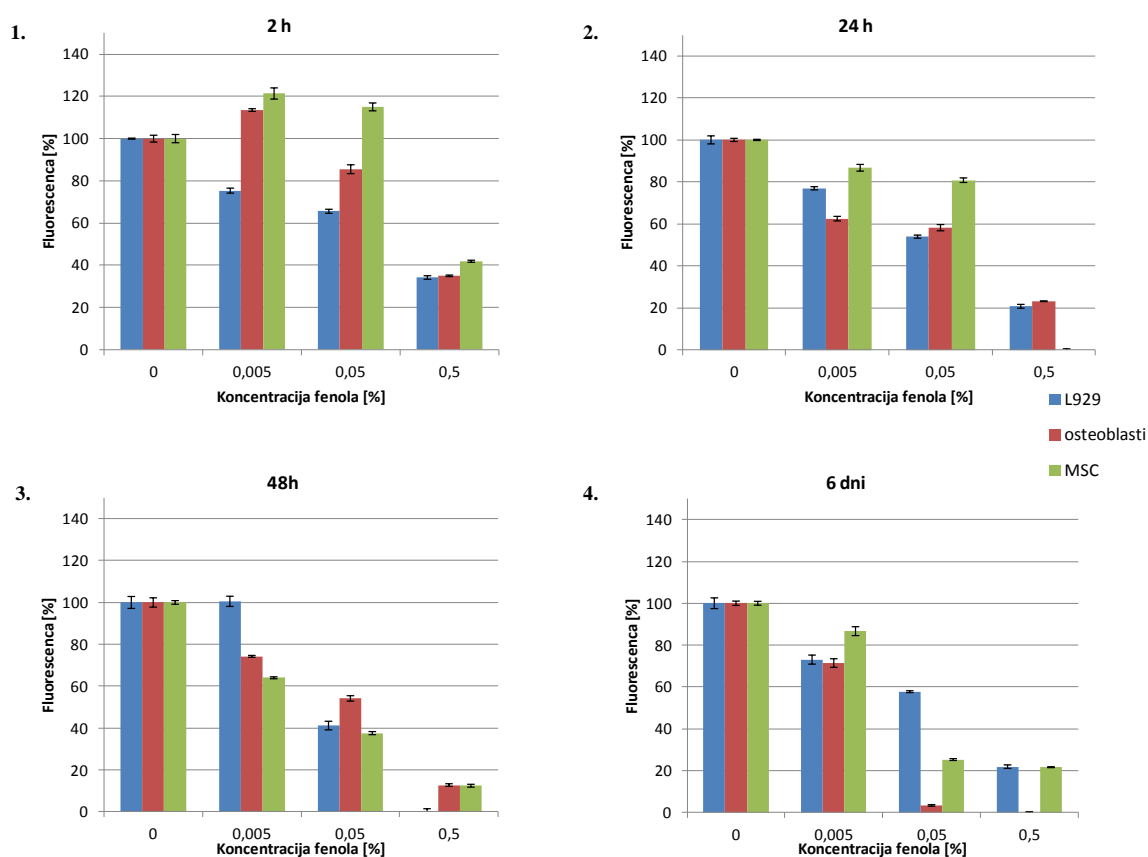


Slika 12: Primerjava metod s sistemom ekstrakcije na celicah MSC
Test je bil izveden v štirih časovnicah po dodatku fenola v različnih koncentracijah.

4.1.2 Primerjava celic

4.1.2.1 Test s kalceinom

Rezultati testa s kalceinom nam v primerjavi s primarnima kulturama pokažejo večjo občutljivost celične linije. Odstotek fluorescence celic L929 je v primerjavi s pozitivno kontrolo signifikantno nižji že po 2 urah, vendar razlike v fluorescenci med časovnimi točkami precej variirajo (slika 13-1). Po 24 in 48 urah se razlika v fluorescenci med različnimi tipi celic zmanjša (sliki 13-1 in 13-2). Po 6 dneh inkubacije pa je največji vpliv testiranih koncentracij fenola na osteoblaste, na kar kažeta rezultata 0,05 in 0,5 % koncentracije fenola (slika 13-4).

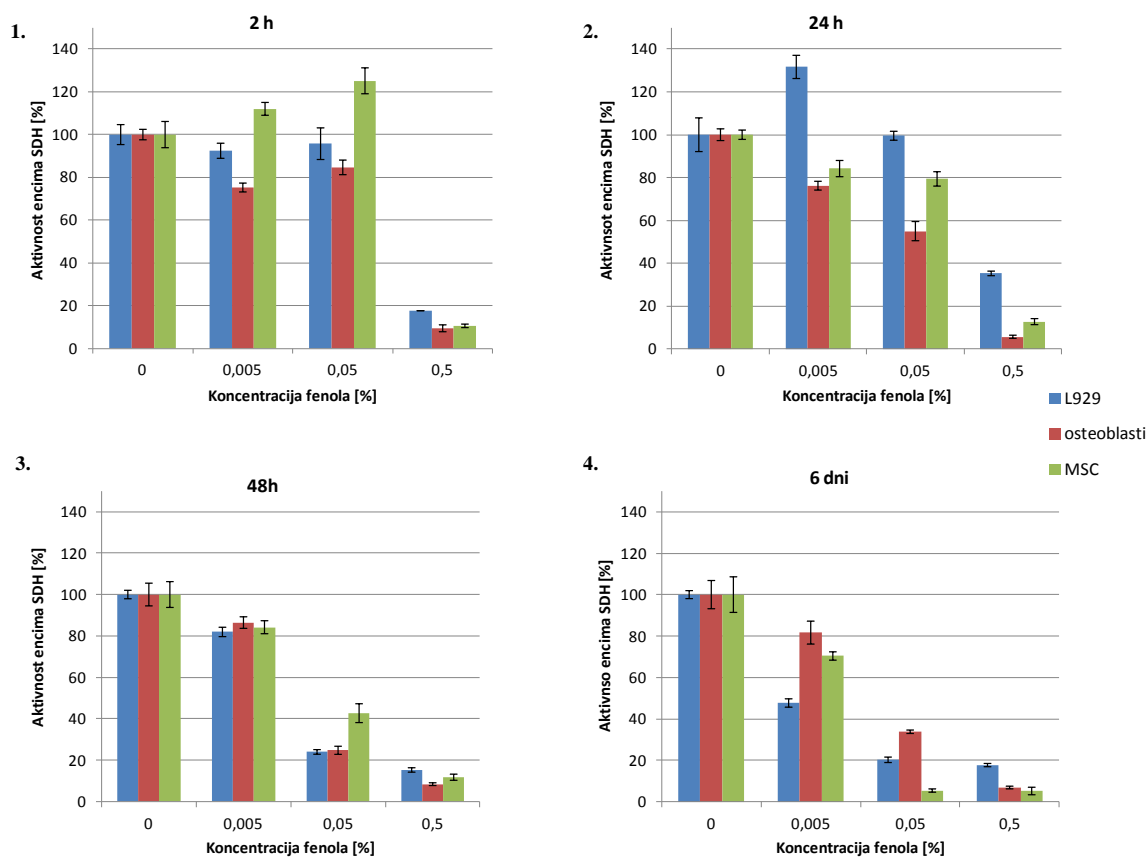


Slika 13: Test s kalceinom

Testi so bili izvedeni na 3 celičnih tipih v štirih časovnicah in štirih različnih koncentracijah fenola.

4.1.2.2 Test MTT

Aktivnost encima SDH se pri času 2 ur med celicami precej razlikuje, opazimo signifikantno povišanje aktivnosti pri MSC (slika 14-1). Tudi po 24 urah zaznamo razlike med celicami, v tem primeru zaznamo višjo aktivnost encima celic L929 pri vseh koncentracijah (slika 14-2). Po 48 urah se vse celice odzivajo podobno (slika 14-3), rezultati 6. dne pa kažejo, da je aktivnost encima posameznega tipa celic odvisna predvsem od koncentracije fenola (slika 14-4).



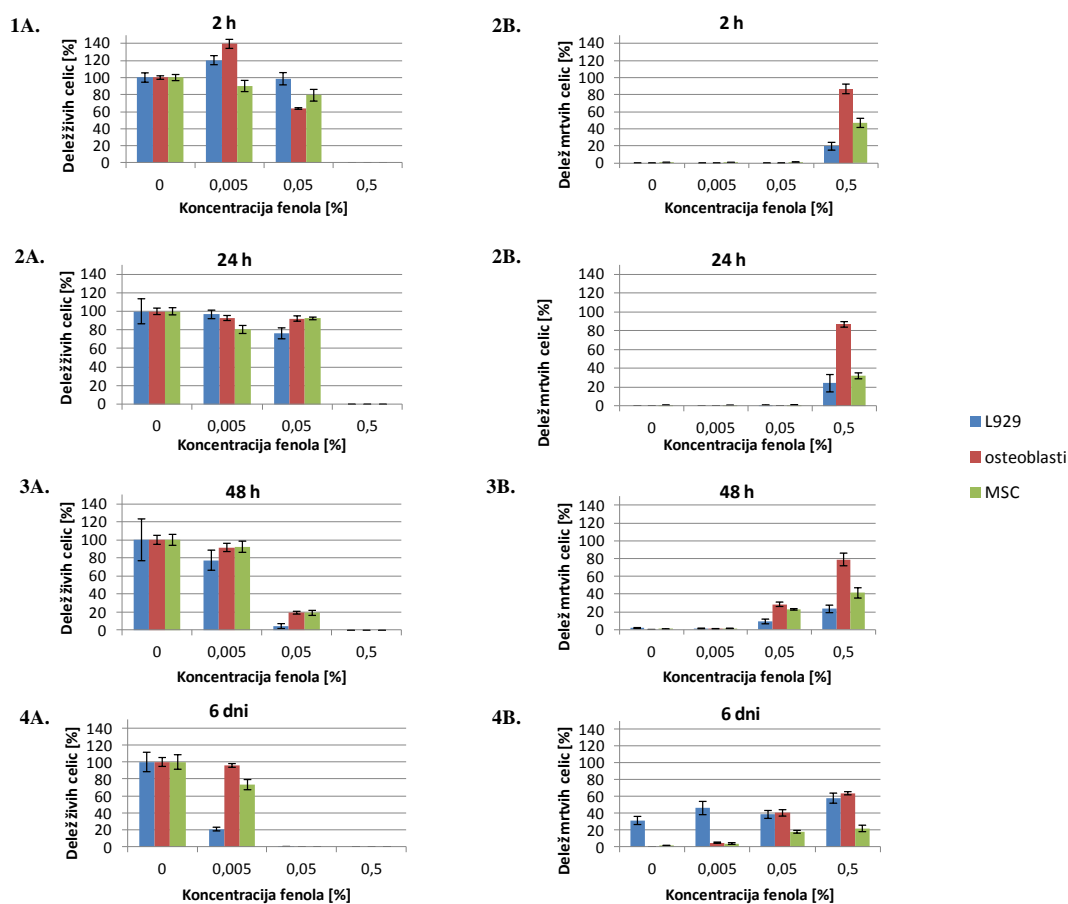
Slika 14: Test MTT

Testi so bili izvedeni na 3 celičnih tipih v štirih časovnicah in štirih različnih koncentracijah fenola.

4.1.2.3 Test barvanja s tripan modrim

Rezultati testa barvanja s tripan modrim kažejo, da je do največjega upada deleža živih celic vseh 3 celičnih tipov prišlo po 48 urah (slika 15-3A). Do tega časa iz grafov deleža živih celic ni vidnih signifikantnih razlik med celično linijo in primarnima kulturama. Vendar na to razliko kaže rezultat 0,005 % koncentracije fenola po 6 urah, kjer je delež živih celic celične linije signifikantno nižji od deleža osteoblastov in MSC (slika 15-4A).

Vsi grafi mrtvih celic pri pozitivni kontroli kažejo na večji odstotek osteoblastov, vendar iz grafov z deležem živih celic vidimo, da je živost pri tej koncentraciji pri vseh celičnih tipih enaka (slika 15).



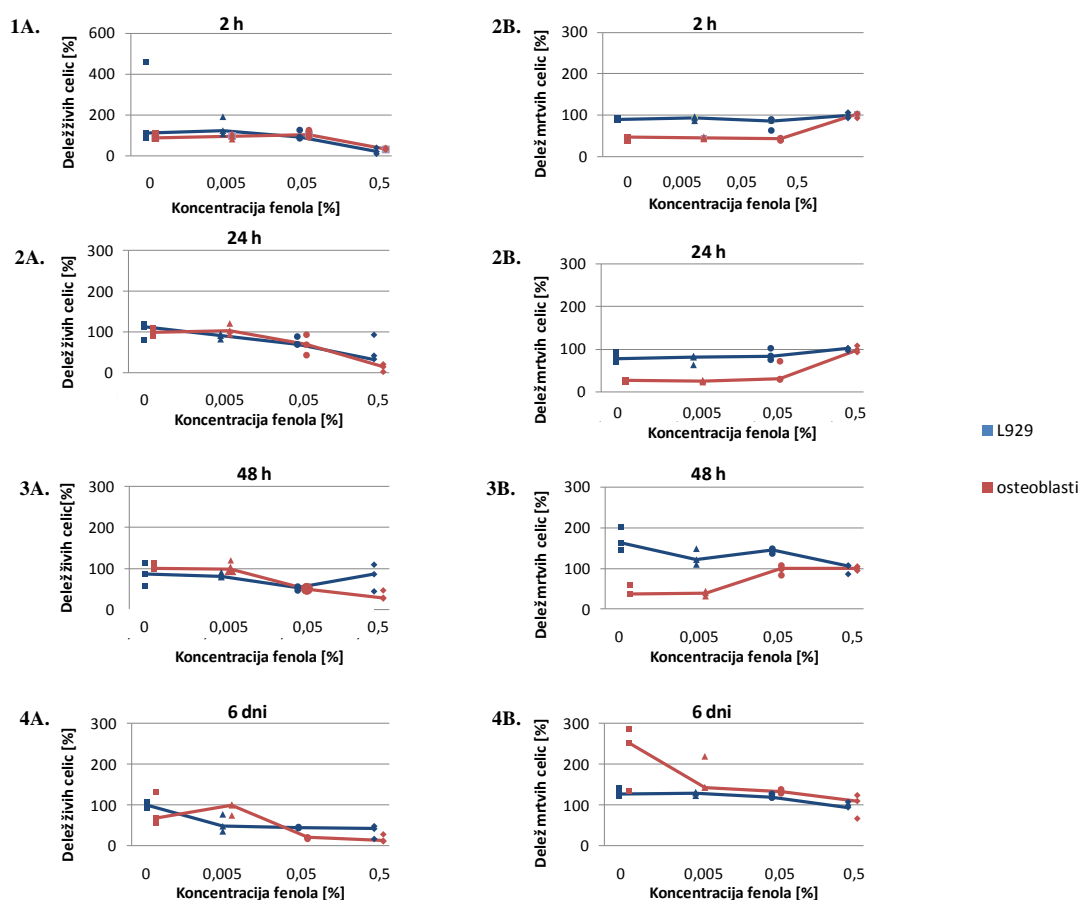
Slika 15: Test barvanja s tripan modrim

Testi so bili izvedeni na 3 celičnih tipih v štirih časovnicah in štirih različnih koncentracijah fenola.

4.1.2.4 TEST LDH

Rezultati testa LDH, ki prikazujejo žive celice, po 2 in 24 urah ne kažejo razlik med celičnima tipoma (slika 16-3A in 16-3B). Razlika med osteoblasti in L929 je razvidna šele po 6 dneh, delež živih osteoblastov višji pri koncentraciji 0,005 %, pri ostalih koncentracijah pa je višji delež živih L929 (sliki 16-4A in 16-4B).

Iz grafov z mrtvimi celicami vidimo, da je občutljivost L929 večja do 48 ur, kasneje (po 6 dneh) je delež mrtvih celic večji pri osteoblastih.



Slika 16: Test LDH

Testi so bili izvedeni na 2 celičnih tipih v štirih časovnicah in štirih različnih koncentracijah fenola. Vsak graf prikazuje tri tehnične ponovitve za vsako od koncentracij fenola. Srednji izmed rezultatov tehničnih ponovitev so med seboj povezani.

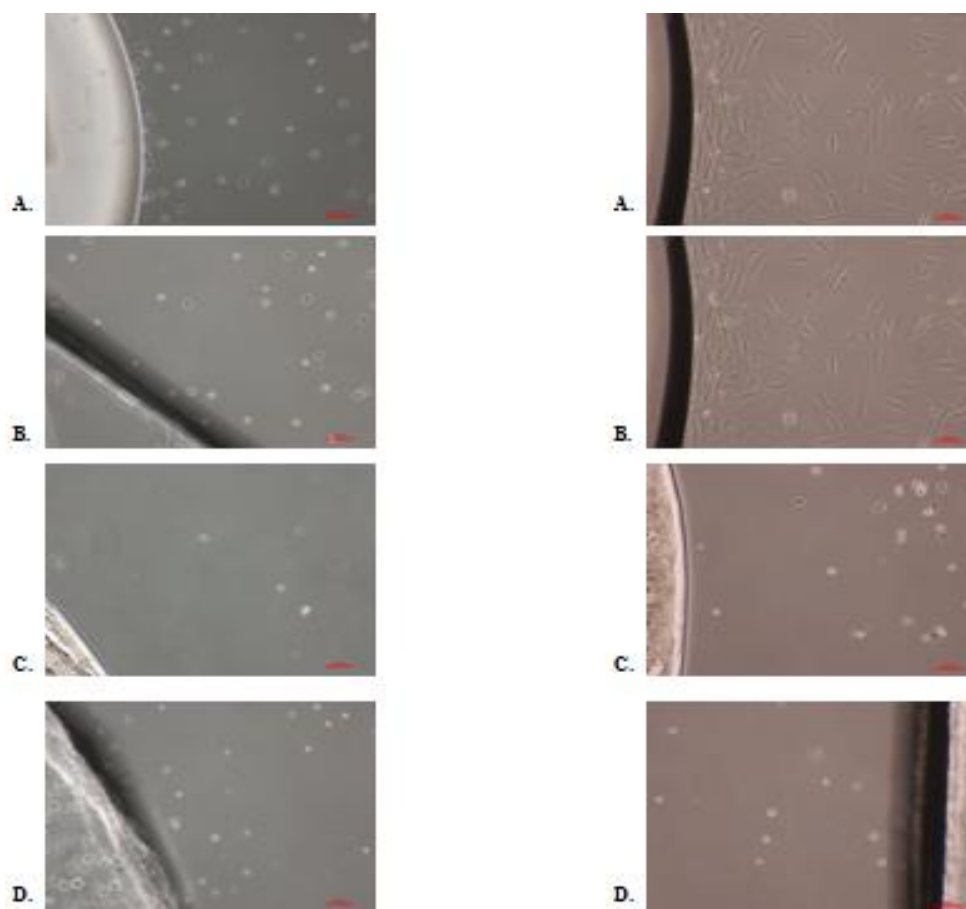
Dobljeni rezultati nam pokažejo, da je celična linija L929 bolj občutljiva na toksične učinke fenola kot primarni celični kulturi. Pri celični liniji pri testu s kalceinom, prišlo do significantnih razlik med negativno kontrolo in tretiranimi celicami že po dvournem izpostavljanju fenolu, pri primarnih celičnih kulturah pa po 24 oziroma 48-urni izpostavitvi (slika 21). Prav tako večjo občutljivost celične linije kažejo tudi rezultati barvanja s tripan modrim in MTT, kjer je pri 0,005 % koncentraciji fenola precej manj živih celic L929 kot osteoblastov in MSC.

Poleg razlik v časovni izpostavitvi, lahko iz rezultatov testa MTT in kalceina (sliki 13 in 14) sklepamo tudi na razlike v koncentracijski občutljivosti. Celice L929 so bolj občutljive na nižje koncentracije fenola (koncentracija 0,005 %), osteoblasti in MSC pa na višje koncentracije (0,05 in 0,5 %). Poleg tega je od celičnega tipa odvisno tudi, kdaj zaznamo vpliv toksične substance. Celice L929 se hitreje odzovejo, medtem, ko smo negativen vpliv fenola pri primarnih celičnih kulturah zaznali šele po 6 dneh.

4.2 CITOTOKSIČNOST S SISTEMOM DIREKTNEGA KONTAKTA

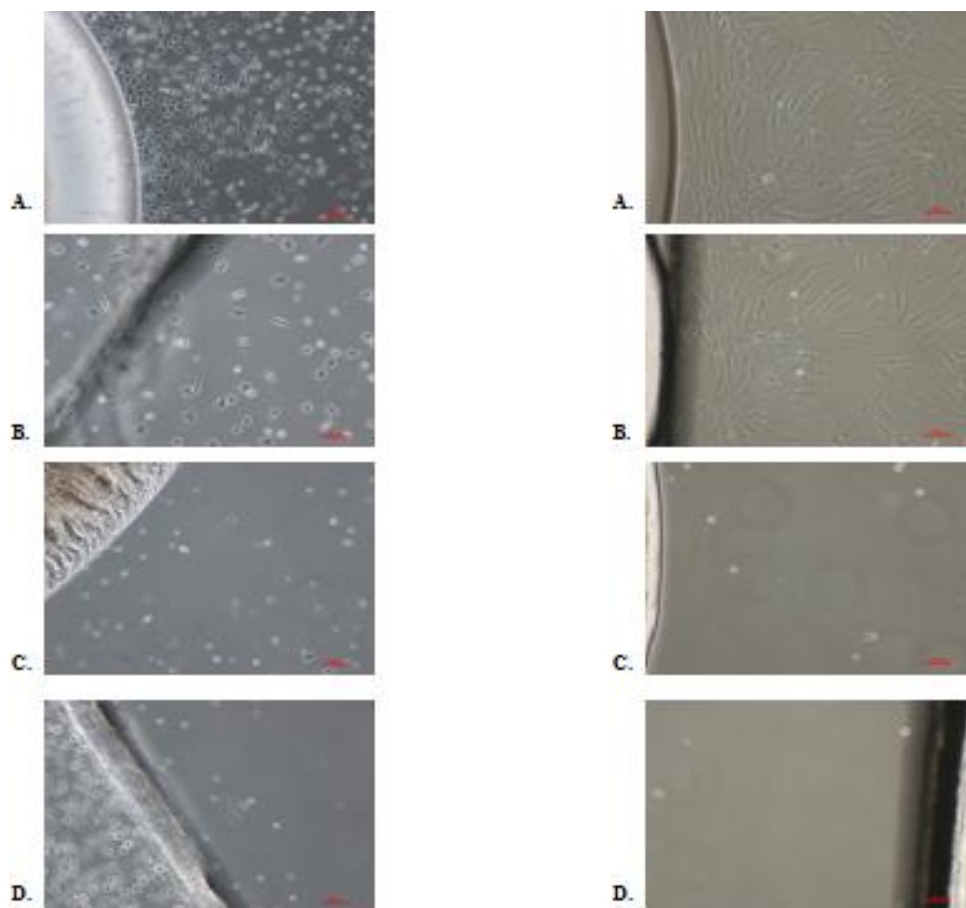
4.2.1 Sistem direktnega kontakta na validiranih in certificiranih materialih

Iz rezultatov direktnega kontakta smo že po prvem dnevu opazili citotoksičen vpliv materialov C in D tako na L929 kot na MSC (slike 17-C in 17-D). Odziv celic na negativno kontrolo (material A) in šibko pozitivno kontrolo (material B) po tem času težko opredelimo (slike 17-A in 17-B).



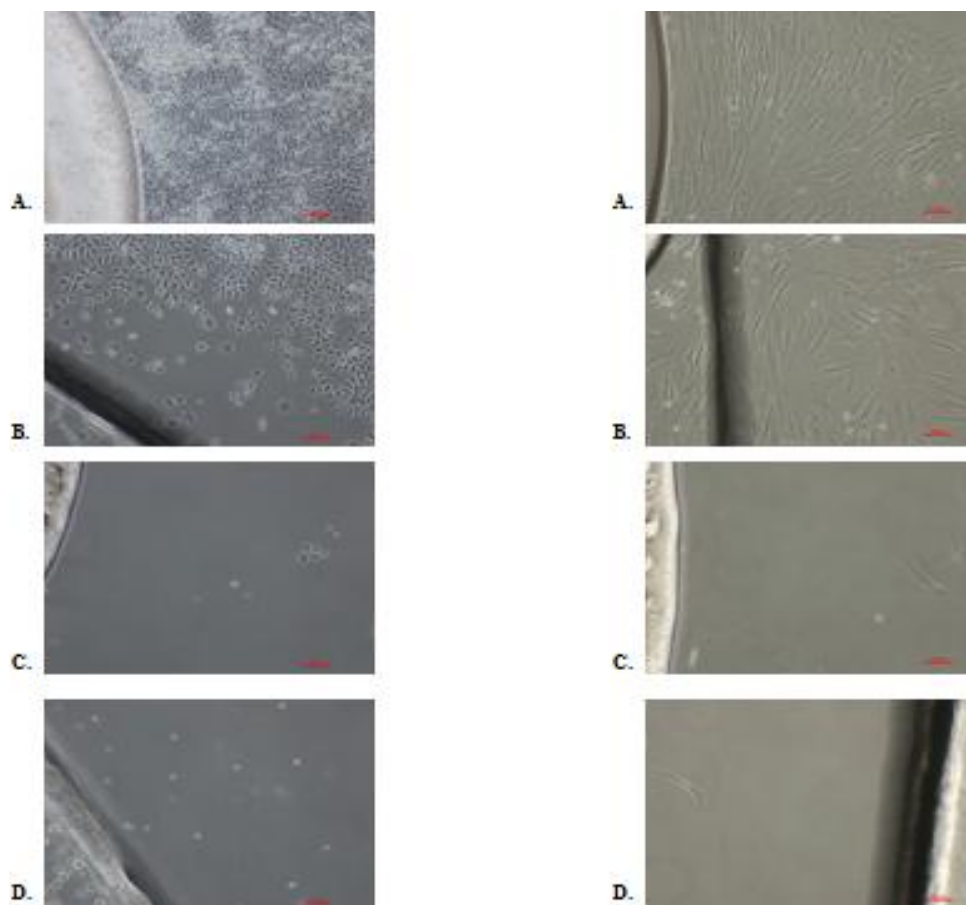
Slika 17: Sistem direktnega kontakta na validiranih in certificiranih materialih, 1. dan
Negativna kontrola A (1.), šibka pozitivna kontrola B (2.), močna pozitivna kontrola C (3.), močna pozitivna kontrola D (4.).
Levi stolpec prikazuje poskus s celicami L929, desni pa z MSC.

Po 3. dnevu vidimo, da material A nima toksičnega učinka ne na L929 in ne na MSC, saj celice nimajo spremenjene morfologije in rastejo tudi na stiku z materialom (sliki 18A). Enako so se odzvale MSC na material B, malo manjšo gostoto celic smo dobili pri L929 (sliki 18-B). Materiala C in D kažeta citotoksičen vpliv na oba celična tipa, saj imajo celice močno spremenjeno morfologijo oz. so že odmrle (slike 18-C in 18-D).



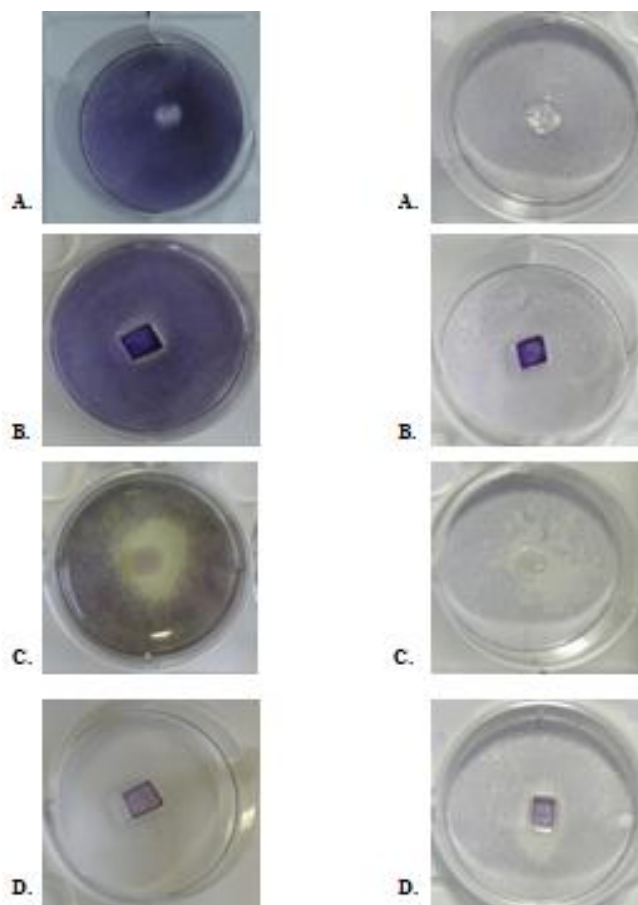
Slika 18: Sistem direktnega kontakta na validiranih in certificiranih materialih, 3. dan
Negativna kontrola A (1.), šibka pozitivna kontrola B (2.), močna pozitivna kontrola C (3.), močna pozitivna kontrola D (4.).
Levi stolpec prikazuje poskus s celicami L929, desni pa z MSC.

Po 7. dneh so bile L929 in MSC v gojilnih posodah z materialom A konfluentne. Material torej nima negativnega vpliva na rast in razmnoževanje, prav tako nismo opazili morfoloških sprememb (sliki 19-A). Pri materialu B je pri obeh celičnih tipih predvsem ob stiku z materialom prišlo do manjše gostote rasti in spremembe v morfologiji (sliki 19-B). Obe močni pozitivni kontroli (material C in D) sta pri obeh tipih celičnih kultur povzročili cone inhibicije, le, da je površina le-te pri kulturi MSC manjša (slike 19-C in 19-D).



Slika 19: Sistem direktnega kontakta na validiranih in certificiranih materialih, 7. dan
Negativna kontrola A (1.), šibka pozitivna kontrola B (2.), močna pozitivna kontrola C (3.), močna pozitivna kontrola D (4.).
Levi stolpec prikazuje poskus s celicami L929, desni pa z MSC.

Pri materialu A ni prišlo ne do cone inhibicije in ne do con zmanjšanih rasti (sliki 20-A). Slednje so nastale pri obeh tipih celic pri materialu (sliki 20-B). Material C je povzročil nastanek cone inhibicije in con zmanjšanih rasti pri obeh celičnih tipih (sliki 20-C). Do največje razlike med celičnima tipoma je prišlo pri certificirani močni pozitivni kontroli (material D), kjer so L929 umrle po celotni gojilni površini, pri MSC je cona inhibicije manjša, opazimo tudi zmanjšano rast (sliki 20-D).

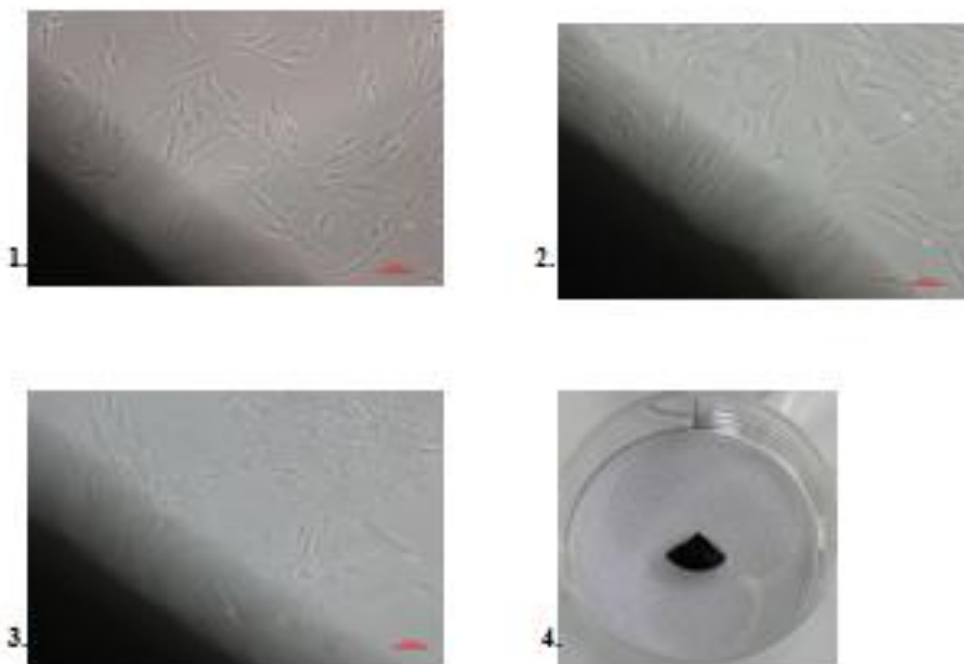


Slika 20: Sistem direktnega kontakta na validiranih in certificiranih materialih, 8. dan
Negativna kontrola A (1.), šibka pozitivna kontrola B (2.), močna pozitivna kontrola C (3.), močna pozitivna kontrola D (4.).
Levi stolpec prikazuje poskus s celicami L929, desni pa z MSC.

4.2.2 Sistem direktnega kontakta na neznanem vzorčnem materialu

Poskus direktnega kontakta smo poleg kontrol izvedli še na neznanem vzorčnem materialu, pri čemer smo uporabili MSC.

Neznani material ni povzročil cone inhibicije, prišlo pa je do zmanjšane rasti MSC (slika 21). Rezultati tega materiala so primerljivi z materialom B (šibko pozitivno kontrolo).



Slika 21: Sistem direktnega kontakta na neznanem vzorčnem materialu
Slike prikazujejo rezultate 1., 3., 7. in 8. dne.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 CITOTOKSIČNOST S SISTEMOM EKSTRAKCIJE

Sistem ekstrakcije omogoča tako kvalitativno kot tudi kvantitativno določanje citotoksičnega vpliva (ISO 10993-5) in se tako uporablja za določanje citotoksičnosti tekočin kot tudi biomaterialov.

V naši nalogi smo za citotoksično substanco pri vseh metodah s sistemom ekstrakcije uporabili fenol v štirih različnih koncentracijah. Toksičen učinek fenola je namreč učinkovit, ponovljiv in neselektiven, poleg tega ga standard ISO 10993 predlaga kot najbolj primerno pozitivno kontrolo. Citotoksičnost substance je odvisna od koncentracije, časa izpostavljenosti celic substanci in celičnega tipa (Cenni in sod., 1999).

5.1.1 Primerjava metod

Vse izvedene metode so metode za določanje živosti in števila celic. Z metodo s kalceinom in metodo MTT zaznavamo le žive, z metodo barvanja s tripan modrim in metodo LDH pa žive in mrtve celice. Metode se razlikujejo tudi glede na to ali zaznavajo živost celic ali njihovo metabolno aktivnost (Cho, 2008). Metabolno aktivnost lahko izmerimo le, ko so celice žive. Poleg tega iz metabolne aktivnosti ne moremo sklepati na točen delež živosti. Vendar pa prav zaradi razlik v mehanizmu delovanja zaznavamo moč vpliva substance na celice, v katerih se kot odgovor na stres poveča metabolna aktivnost, ali pa vplivu podležejo in pride do celične smrti, pri čemer lahko spremembe v odzivu spremljamo tudi časovno.

Tako pri metodi s kalceinom z izmerjeno fluorescenco dobimo delež živih celic. Metoda nam torej ne da podatka o mrtvih celicah. Slabost metode s kalceinom je, da izmerimo fluorescenco tudi pri pozitivni kontroli. Ta glede na fluorescenco negativne kontrole včasih znaša kar 50 %, s čimer dobimo veliko ozadja, ki lahko oteži opredeljevanje o citotoksičnem vplivu različnih testnih substanc. Vendar smo razlike med koncentracijami toksične substance zaznali že po 2 urah, kar je prednost pred ostalimi metodami.

Z metodo MTT prav tako merimo le delež živih celic. Metoda je vezana na aktivnost mitohondrijskega encima SDH in nam da podatke o presnovni aktivnosti celice. Rezultati, ki jih dobimo, so lahko ali odraz spremembe v številu celic ali spremembe v metabolni aktivnosti celic. Oba podatka nam podata informacijo o stanju celice in vplivu proučevane substance na celice, vendar ne moremo biti sigurni, kateri podatek je prevladoval. Opazili smo, da so razlike v aktivnosti encima med koncentracijami opazne po 24 urah in kasneje.

Z metodo barvanja s tripan modrim hkrati preštujemo žive in mrtve celice, vendar je izvedba dolgotrajna in zahtevna, obenem moramo biti relativno hitri in natančni, saj je predolga izpostavljenost celic barvilu za celice lahko toksična in povzroči obarvanje prej živih celic, pri čemer dobimo lažne pozitivne rezultate. Kot največji problem se je izkazalo določanje mrtvih

celic, kjer smo glede na rezultate živih celic dobivali prenizke rezultate. To je lahko posledica izvedbe testa, saj se celice po celični smrti odlepajo od podlage in jih zato pri barvanju zlahka odpipetiramo stran. Poleg tega celice po smrti lizirajo in takih celic z barvanjem ne moremo zaznati. Pozitivna lastnost metode je, da za dobljene rezultate z gotovostjo lahko rečemo, da so odraz tistega, kar prikazujejo, saj smo celice opazovali pod mikroskopom in tako rezultate objektivne kvantifikacije sproti preverjali tudi s subjektivno oceno. Kljub vsemu je pri preveliki gostoti celic težko ločiti posamezne celice med seboj, kar je najverjetneje tudi posledica za kar 40 % višjega deleža živih osteoblastov pri koncentraciji 0,005 % po 2 urah (slika 15-1A).

Pri metodi LDH hkrati izvajamo 2 variaciji istega testa. Z enim dobimo število mrtvih celic, z drugim pa celokupno število celic, vendar to ne oteži in bistveno ne podaljša izvedbe testa. S tako izvedbo metode torej, tako kot pri metodi barvanja s tripan modrim, dobimo podatke o deležu živih in mrtvih celic. Ker upada preživetja celic v kontrolah nismo dobili pri nobeni od ostalih metod, poleg tega pa tak odziv ni običajen, lahko z gotovostjo rečemo, da je dobljen rezultat posledica pomanjkanja hranil v brezserumskem gojišču.

Ponekod smo pri določenih časih dobili nenavadno porast v živosti oz. aktivnosti metabolizma. To bi lahko pripisali izhlapevanju fenola, s čimer se njegoja koncentracija v gojišču spremeni in toksičen učinek je manjši.

Iz naših rezultatov vidimo, da metode dajejo različne rezultate, sklepamo pa, da so rezultati metod, ki določajo živost celic bolj podobni, kot rezultati teh metod v primerjavi z metodo MTT.

Zato je za ugotovitev dejanskega stanja kulture priporočljivo, da poleg določanja deleža živih celic vzporedno izvedemo še eno izmed metod, ki temelji na metabolni aktivnosti in tako s primerjavo metod ugotovimo, ali substanca vpliva na metabolizem celice ali na njeno živost.

S primerjavo rezultatov metod sistema ekstrakcije tako lahko ugotovimo, kakšen vpliv ima substanca na celico. Če rezultati testa MTT sovpadajo z rezultati štetja celic s tripan modrim, rezultati testa LDH pa z rezultati testa s kalceinom, to pomeni, da gre za vpliv substance na membrano in s tem na živost. Če rezultati niso primerljivi v tej meri in če z metodo MTT glede na ostale rezultate dobimo večji odziv, pomeni, da proučevana substanca vpliva na celični metabolizem. Naši rezultati metod sistema ekstrakcije se med seboj bistveno ne razlikujejo, kar potrjuje ugotovitve predhodnih raziskav, da fenol močno vpliva na integriteto membrane (Hugo, 1978).

Glede določanja živih celic lahko rečemo, da je poleg metode s kalceinom najbolj natančna metoda barvanja s tripan modrim, kar pa ne velja za določanje mrtvih celic, saj se mrtve celice odlepajo od podlage in jih lahko pred barvanjem nenamerno odstranimo skupaj z gojiščem. Poleg tega se del odmrlih celic že razgradi in jih zato ne vidimo kot modro obarvane. Problem nenamernega odstranjevanja mrtvih celic smo deloma rešili s predhodnim

pet minutnim centrifugiranjem pri 300 RCF, vendar rezultati najvišje koncentracije fenola pri obeh vrstah humanih celic kažejo, da modifikacija protokola ni v celoti rešila težave. Zato pri določanju citotoksičnosti uporabljamo več metod in pomanjkljivost barvanja s tripanom rešujemo s primerjavo rezultatov deleža mrtvih celic, dobljenih z metodo LDH.

Metoda s kalceinom se je izkazala za bolj občutljivo od metode MTT, glede na izvedbo je to tudi najpreprostejša in najhitrejša metoda.

Rezultati vseh metod nam kažejo visoko citotoksičnost pozitivne kontrole, saj je večina celic mrtva že po 2 urah, medtem, ko fenol v manjši koncentraciji (0,05 %) navadno uniči celice po 48 urah. V primerih 0,005 % fenola pri nekaterih metodah dobimo celo višje vrednosti deleža živih celic in se citotoksičen učinek pokaže kasneje, iz česar sklepamo, da nizka koncentracija substance kratkoročno pospeši metabolizem celic, kar je posledica odziva celic na stres iz okolja.

5.1.2 Primerjava celic

Poskus smo izvedli s 3 zelo različnimi tipi celic. Celice L929 so nesmrtno, nimajo posebne funkcije in se samo hitro delijo. MSC imajo tudi kratek generacijski čas, vendar daljši od L929, poleg tega so multipotentne in morajo vzdrževati svojo funkcijo. Osteoblasti so za razliko od MSC diferencirani in se zato najtežje delijo. Zaradi različnosti v celičnih tipih iz rezultatov ne moremo potegniti splošnih vzporednic med celično linijo in primarnimi celičnimi kulturami. Lažje bi bilo, če bi kot primarni kulturi izbrali 2 tipa diferenciranih celic. Tako bi bile razlike med L929 in takima tipoma celic večje.

Iz dobljenih rezultatov sklepamo, da je celična linija L929 na toksične učinke fenola bolj občutljiva kot primarni celični kulturi, saj se pri L929 negativen vpliv fenola pojavi po krajšem času in pri nižjih koncentracijah substance, kot pri osteoblastih in MSC, kar je najbolj signifikantno razvidno pri metodi s kalceinom (slika 13).

Večja občutljivost celične linije je lahko posledica hitrejšega podvojevanja. Celična linija ima namreč krajši generacijski čas in zato v določenem času večkrat preide v fazo mitoze, v kateri so celice najbolj dovzetne za toksične učinke fizikalnih in kemičnih agensov (Pawlik in Keyomarsi, 2004). Vendar pa tega ne moremo trditi za razlike v občutljivosti med osteoblasti in MSC, saj se osteoblasti delijo počasneje, toda iz rezultatov razberemo, da so bolj občutljivi na fenol, kot MSC.

Vsi trije tipi celičnih kultur so bili enako tretirani in izpostavljeni enakim pogojem inkubacije, zato z gotovostjo lahko trdimo, da so dobljeni rezultati odraz razlik ne le med celičnimi kulturami, temveč tudi med celičnimi tipi.

Poleg tega fenol na celične membrane deluje nespecifično (Hugo, 1978), kar smo tudi pokazali s primerjavo rezultatov MTT in ostalih metod. Ugotavljamo, da je zato nivo razlik med primarnimi celičnimi kulturami in celičnimi linijami manjši in ocenjujemo, da bodo pri testiranjih specifičnih substanc razlike precej večje, ker bodo vplivale na točno določeno funkcijo, ki je lahko v nekaterih celičnih tipih bolj izražena. Tako bodo te celice izkazovale večji stres in bo substanca zanje bolj citotoksična kot za ostale celične tipe.

5.2 CITOTOKSIČNOST S SISTEMOM DIREKTNEGA KONTAKTA

Sistem direktnega kontakta omogoča neposreden stik med materialom in celično linijo, kar bolje ponazarja dejansko stanje v telesu. Kako se bo celica odzvala na material, je odvisno tudi od oddaljenosti celice in materiala in s tem koncentracije potencialne toksičnosti materiala. Direktni kontakt, za razliko od sistema ekstrakcije, ponazarja koncentracijsko odvisnost od razdalje. Zato smo poleg sistema z ekstrakcijo izvedli tudi testiranje s sistemom direktnega kontakta.

Material A, ki je hkrati tudi pritrjevalno sredstvo za ostale materiale, ne vpliva na rast, razmnoževanje ter morfologijo celic pri nobenem od uporabljenih celičnih tipov. Celice rastejo tudi v stiku z materialom, na nekaterih delih, predvsem pri celičnih linijah, celo po površini materiala. Ta material je torej ustrezna negativna kontrola, kar smo ugotovili tudi v naših eksperimentih (sliki 19-A).

Material B, ki smo ga uporabili kot šibko pozitivno kontrolo, je manj toksičen, saj pri MSC ni prišlo do nastanka tipične cone inhibicije. V tem primeru lahko govorimo o zmanjšani rasti predvsem v stiku z materialom, saj je na tem delu kulture in materiala jasno vidna manjša gostota celic v primerjavi s kontrolo, poleg tega imajo nekatere celice nekoliko bolj razpotegnjeno morfologijo, kar je indikator določene mere stresa, ki so ji celice zaradi materiala podvržene. V nasprotju z MSC je do večjega vpliva na rast prišlo pri celični liniji, kjer lahko govorimo o minimalni coni inhibicije (sliki 20-B).

V primeru materiala B opazimo tudi rast celic pod samim materialom, kar je posledica prevelike količine pritrjevalnega sredstva, na katerega so se po dodatku celične suspenzije celice pritrldile. Celice so bile tako v kontaktu z negativno in šibko pozitivno kontrolo obenem. Vendar tudi rast v tem območju kaže na manjšo občutljivost MSC na material B. Tako so v tem primeru dobljeni rezultati še vedno relevantni in reprezentativni glede na ponovitve poskusa, pri katerih ni prišlo do presežka pritrjevalnega sredstva, po barvanju z MTT pa smo ugotovili enak odziv celic.

Material C in D sta močni pozitivni kontroli, kar z dobljenimi rezultati lahko potrdimo (slike 20 C in 20-D). Pri materialu C so razlike toksičnih učinkov med celičnima tipoma manjše kot pri materialu D. To bi lahko bila posledica nastajanja prostih radikalov, lipidne peroksidacije in posledično lize celične membrane (Papatheofanis, 1989), kar je zelo nespecifično in zato vpliva na vse celice enako.

Kljub temu, da je material D akreditiran kot močna pozitivna kontrola in celo priporočen v standardu ISO 10993, reproducibilno opazimo največje razlike med odzivi uporabljenih celičnih tipov. Citotoksičen vpliv materiala D je večji pri celični liniji, saj so L929 za razliko od MSC odmrle po celotni površini gojilne posode. Referenčna materiala (materiala B in D), ki smo ju uporabili, sta testirana kot standard in sta ponovljivo toksična, vendar sta testirana le na celičnih linijah.

Ker sta materiala B in D certificirana kot močno, oziroma šibko toksična, je odziv celične linije pričakovan. Vendar se v primerjavi s celično linijo primarne celične kulture na referenčne materiale odzovejo drugače. Razlike v občutljivosti na referenčne materiale so bile že pokazane. Park in sod. (2002) so v svoji študiji ugotovili razlike v občutljivosti različnih celičnih linij na referenčni material, pri kateri so dobili različno velike cone inhibicij, pri nobenem tipu celične linije pa ni prišlo do propada celic po celotni površini.

Ker pri testiranih kontrolah prihaja do razlik med celično linijo in primarno kulturo, lahko sklepamo, da se bodo le-te pojavljale tudi pri različnih drugih materialih. To bi lahko pomenilo razliko v rezultatih (lažno pozitivni ali lažno negativni rezultati), kar spet kaže na pomembnost uporabe primarnih celičnih kultur in standardizacijo izbire referenčnega materiala.

Pri ugotavljanju učinka neznanega materiala na rast MSC (slika 21-3) smo opazili, da je le-ta primerljiv s šibko pozitivno kontrolo (material B) (slika 19-B desno).

Pri pozitivnih kontrolah (materiali B, C in D) smo v primeru celične linije pričakovano dobili cone inhibicije, oziroma cone zmanjšane rasti, ki pa niso tako zelo izrazite pri MSC. To sovпада z ugotovitvami o razlikah občutljivosti tipov celičnih kultur, kar smo pokazali z rezultati metod sistema ekstrakcije. Večjo občutljivost celične linije L929 na toksičnost uporabljenih materialov bi lahko pripisali celični delitvi, celice so v enako dolgem poskusnem času večkrat v fazi mitoze, kjer je občutljivost največja (Pawlik in Keyomarsi, 2004).

Glede na dobljene rezultate v splošnem lahko rečemo, da material A ni toksičen, saj ne pride do nastanka cone inhibicije niti do zmanjšane rasti, material B je malo toksičen, saj povzroči zmanjšanje rasti, ne pa tudi cone inhibicije, materiala C in D pa sta toksična, saj nastane cone inhibicije in zmanjšana rast.

Ker se v telesu snovi z mesta implantacije konstantno spirajo s krvnim obtokom, lahko pričakujemo, da majhni negativni učinki materiala, ki jih zaznamo s testiranjem *in vitro* ne bodo izkazovali citotoksičnih učinkov v pogojih *in vivo* in tak material je potencialno primeren za uporabo pri zdravljenju, seveda z opravljenimi ustreznimi *in vivo* testi.

Pokazali smo, da so vsi uporabljeni biomateriali primerni za primerjavo vzorčnih biomaterialov in da rezultati variirajo glede na uporabljen celični tip, torej je pomembno izbrati tiste celice, ki bodo uporabljene tudi v končnem produktu vsadka ali v stiku z vsadkom v telesu.

5.3 PRIMERJAVA REZULTATOV EKSTRAKCIJSKEGA TESTA IN DIREKTNEGA KONTAKTA

Z obema sistemoma testiranja citotoksičnosti smo ugotovili, da je celična linija bolj občutljiva na citotoksičnost substanc. Čeprav pri testiranju s sistemom direktnega kontakta nismo uporabili 2 vrst primarnih celičnih kultur, nastale cone inhibicije pri L929 in cone zmanjšane rasti pri MSC jasno kažejo razlike v občutljivosti med celično linijo in primarno celično kulturo, kar smo ugotovili tudi pri sistemu ekstrakcije.

Vse *in vitro* metode, uporabljene v poskusu, merijo bazalno citotoksičnost. Iz dobljenih rezultatov vidimo velike razlike, ne samo med celično linijo in primarno kulturo, temveč tudi med celičnimi tipi. Razlike v občutljivosti na toksično substanco so torej vidne že na bazalnem nivoju merjenja citotoksičnosti. Naslednji korak bi bil merjenje citotoksičnosti, ki vpliva na specifične celične funkcije, pri čemer je še bolj pomembno uporabljati specializirane celice.

Ključni parametri testiranja citotoksičnosti so celični tip, čas izpostavitve celic toksični substanci, vrsta metode in ovrednotenje metode (Cenni in sod., 1999), vendar je najpomembnejši izbira tistega celičnega tipa, s katerim bo material v stiku v telesu (*in vivo*), saj se celična funkcija in mehanizem toksičnosti med celičnimi tipi razlikujejo (Park in sod., 2002).

6 POVZETEK

Rezultati, ki smo jih dobili v eksperimentalnem delu te naloge, poleg že znanega koncentracijskega in časovno odvisnega vpliva citotoksične substance kažejo tudi na velik vpliv tipa celične kulture, predvsem razlik med celično linijo in primarno kulturo. Razlike v odzivu treh različnih celičnih kultur (celične linije L929 ter primarnih celičnih kultur osteoblastov in MSC) na citotoksične učinke fenola potrjujejo našo hipotezo o pomembnosti izbora celičnega tipa za testiranja biomaterialov. Kljub zahtevnejšem gojenju in rokovanju s primarnimi celicami, je torej že *in vitro* potrebno izbrati ne le primarno kulturo, temveč tudi celični tip, s katerim bo biomaterial ali učinkovina v stiku v telesu.

Poleg tega je ključen tudi izbor metode za ugotavljanje citotoksičnosti. *In vitro* testiranje citotoksičnosti mora vsebovati ugotavljanje (kvantifikacijo) celične viabilnosti in rasti, dobro je, če nam pomaga oceniti tudi število mrtvih celic, vse skupaj pa mora korelirati z modelom *in vivo* (Baek in sod., 2005).

Testi citotoksičnosti, ki za ugotavljanje stanja uporabljajo celični metabolizem in ne celične lize, so le indikatorji aktivnosti znotrajceličnega encima, ki ni nujno odraz celične lize, ampak se lahko izražanje gena za ta encim tudi zniža zaradi stresa (Schäfer in sod. 1997). V predkliničnih testih nobeden od teh dveh parametrov ni zanemarljiv, zato je potrebno izbrati teste, ki stanje najbolj opišejo.

Iz rezultatov naše raziskave lahko sklepamo, da obstajajo med testi merjenja živosti s kalceinom in tripan modrim ter aktivnosti encimov z MTT in LDH velike razlike v občutljivosti metod, časovnem odzivu, tehnični izvedbi (materiali in čas potreben za izvedbo testa). Glede na naše rezultate in primerjave med različnimi tipi celic, je za ugotavljanje citotoksičnosti priporočljivo izbrati test s kalceinom v kombinaciji z eno od metod, ki nam da podatke tudi o deležu mrtvih celic (barvanje s tripan modrim in test LDH).

V primerjavi z metodami s sistemom ekstrakcije ima metoda direktnega kontakta številne prednosti, saj najbolj ponazarja fiziološke pogoje, ki *in vivo* nastanejo ob stiku materiala s celicami. Brez posebne dodatne priprave ekstrakta dobimo cono inhibicije, ki predstavlja koncentracijski gradient toksične kemikalije, ali pa opazimo morfološke znake stresa (Baek in sod., 2005). V našem primeru smo pri direktnem kontaktu s celično linijo L929 dobili cono inhibicije, ki bi se jih dalo brez težav tudi kvantitativno določiti (program *Image J*, NIH ZDA), medtem, ko v primeru z MSC dobimo cono inhibicije z nedoločljivim robom in vmesnimi tako imenovanimi conami zmanjšane rasti, iz česar ne moramo določiti relevantnega kvantitativnega rezultata. Kljub pozitivnim lastnostim sistema direktnega kontakta je potrebno upoštevati, da je izbira sistema odvisna tudi od vrste in lastnosti proučevane substance oz. materiala.

Kljub razlikam v delovanju sistema z ekstrakcijo in sistema direktnega kontakta, smo z obema ugotovili različen odziv celične linije v primerjavi s primarnimi celicami in pokazali, da v

predkliničnih testiranjih biokompatibilnosti z uporabo primarnih celic dobimo bolj relevantne rezultate in je zato tudi vrednost raziskav večja.

Z raziskavo smo potrdili postavljeni hipotezi, da se bodo rezultati izvedenih metod zaradi zaznavanja različnih biomarkerjev med seboj razlikovali ter da se bodo primarne kulture na toksično substanco odzvale drugače kot celična linija. Ugotovili smo, da je za zanesljivo opredelitev citotoksičnosti pomembno testiranje s kombinacijo vsaj dveh različnih metod, ki kvantitativno podata delež živih in mrtvih celic ter da je pri izboru metod pomemben tudi biomarker, ki ga metoda uporablja. Glede na visoko občutljivost *in vitro* testov smo pokazali, da je za predklinične teste izbira celičnega tipa ključen parameter, ki v primerjavi s testiranjem na celičnih linijah lahko poda rezultate, ki ne bi sovpadali s kasnejšim odzivom v organizmu.

7 VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

- Decker T., Lohmann-Matthes M.L. 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 15: 61–69
- Mosmann T. 1983. Rapid colometric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63
- Kirkpatrick C.J., Bittinger F., Wagner M., Kohler H., van Kooten T.G., Klein C.L., Otto M. 1998. Current trends in biocompatibility testing. *Proceedings of the indtution of mechanical engineers*, 212: 75-84
- Ignatius A.A., Claes L.E. 1996. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L,DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*, 17: 831-839
- Ekwall B., Silano V., Paganuzzi-Stammati A., Zucco F. 1990. Toxicity tests with mammalian cell cultures. V: Short-term toxicity tests for non-genotoxic effects. Bourdeau P., Somers E., Richardson G.M., Hickman J.R. (eds.). John Wiley & Sons, Ltd: 75-97
- Freshney R.I. Basic principles of cell culture. 2006. Culture of cells for tissue engineering. Vunjak-Novakovic G., Freshney R.I. (eds.). John Wiley & Sons, Inc.: 3-22
- Freshney R.I. 2011. Culture of animal cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications John Wiley & Sons, New York
<http://bcs.wiley.com/hebscs/Books?action=chapter&bcsId=5959&itemId=0470528125&chapterId=63144> (26. avg. 2013)
- Monaco E., Bionaz M., Hollister S.J., Wheeler M.B. 2011. Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *Theriogenology*, 75: 1381-1399
- Martino S., D'Angelo F., Armentano I., Kenny J.M., Orlacchio A.. 2012. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnology advances*, 30: 338-351
- Leist in Jäätellä. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2: 589-598
- Riss T.L., Moravec R.A. 2004. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2, 1: 51-62

- Cho M.H., Niles A., Huang R., Inglese J., Austin P. Riss T., Xia M. 2008. A bioluminescent cytotoxicity assay for assesment of membrane integrity using proteolytic biomarker. *Toxicol in vitro*, 22, 84: 1099-1106
- Eisenbrand G., Pool-Zobel B., Baker V., Balls M., Blaauboer B.J., Boobis A. Carere A., Kevekordes S., Lhuguenot J.C., Pieters R., Kleiner J. 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food and chemical toxicology*, 40: 193-236
- Cerioti L., Ponti J., Broggi F., Kob A., Drechsler S., Thedinga E., Colpo P., Sabbioni E., Ehret R., Rossi F. 2007. Real.time assesmet of cytotoxicity by impedance measurement on 96-well plate. *Sensors and Actuators*, 123: 769-778
- Murray P.E., Godoy C.G., Godoy F.G. 2007. How is biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 12: E258-266
- Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A. 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 288: 369-376
- Wang G., Zhang J., Dewilde A.H., Pal A.K., Bello D., Therrien J.M., Braunhut S J., Marx K.A. Understanding and correcting for carbon nanotube inetrfennces with a commercial LDH cytotoxicity assay. *Toxicology*, 299: 99-111
- Michalowicz J., Duda W. 2007. Phenols - Sources and toxicity. *Polish Journal of Enviromental Studies*, 16, 3: 347-362
- Parikka V., Väänänen A., Risteli J., Salo T., Sorsa T., Väänänen H.K., Lehenkari P. 2005. Human mesenchymal stem cell derived osteoblasts degrade organic bone matrix in vitro by matrix mettalloproteinases. *Matrix biology*, 24: 438-447
- Heino T.H., Hentunen T.A., Väänänen H.K. 2004. Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Experimental Cell Research*, 294: 458-468
- Baek H.S., Yoo J.Y., Rah D.K., Han D-W., Lee D.H., Kwon O-H., Park J-C. 2005. Evaluation of the extraction method for the cytotoxicity testing of latex gloves. *Yonsei Medical Journal*, 46, 4: 579-583
- Schäfer H., Schäfer A., Kiderlen A. F., Masihi K. N., Burger R. 1997. A highly sensitive cytotoxicity assay based on the release of reporter enzymes, from stably transfected cell lines. *Journal of Immunological Medicine*, 204: 89-98
- Karp J.M., Leng Teo G.S., 2009. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell stem cell*, 4, 3: 206-216
- Krampera M., Pizzolo G., Aprili G., Franchini M., 2006. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*, 39, 4: 678-683

- Liu Z.J., Zhuge Y., Velazquez O.C. 2009. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106, 6: 984-991
- Puntos I., Jones E., Tzioupis C., McGonagle D., Giannoudis P.V., 2006. Growing bone and cartilage. The role of mesenchymal stem cells. *Journal of Bone and Joint Surgery British*, 88, 4: 421-426
- Fang J., Hall B.K. 1997. Chondrogenic cell differentiation from membrane bone periostera. *Anatomy and Embriology*, 196, 5: 349-362
- Mackie E.J. 2003. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 1301-1305
- Li M., Amizuka N., Oda K., Tokunaga K., Ito T., Takeuchi K., Takagi R., Maeda T. 2004. Histochemical evidence of the initial chondrogenesis and osteogenesis in the periosteum of a rib fractured model: implications of osteocyte involvement in periosteal chondrogenesis. *Microscopy Research and Technique*, 64: 330-342
- Jilka R.L., Weinstein R S., Bellido T., Parfitt A.M., Manolagas S.C. 1998. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13: 793-802
- Manolagas S.C. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 21: 115-137
- Gori F., Hofbauer L.C., Dunstan C.R., Spelsberg T.C., Khosla S., Riggs B.L., 2000. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology*, 141: 4768-4776
- Harada S., Rodan G.A. 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423: 349-355
- Ducy P., Schinke T., Karsenty G. 2000. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 289: 1501-1504
- ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 1999.
- Logotheris C.J., Lin S-H. Osteoblasts in Prostate Cancer Metastasis to Bone. 2005. <http://www.medscape.com/viewarticle/496917> (21. mar. 2013)
- Chowdhury S.M., Lalwani G., Zhang K., Yang j.Y., Neville K., Sitharaman B. 2013. Cell specific cytotoxicity and uptake of graphene nanoribbons. *Biomaterials*, 34: 283-293
- Papatheofanis F.J. 1989. Cytotoxicity of alkyl-2-cyanoacrylate adhesives. *Journal of biomedical materials research*, 23: 661-668

Park J-C., Park B.O., Lee D.H., Suh H., Kim D-G., Kwon O-H. 2002. Evaluation of the cytotoxicity of polyetherurethane (PEU) film containing zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) on various cell lines. *Yonsei medical journal*, 43: 518-526

Hugo W.B. 1978. Phenols: a review of their history and development as antimicrobial agents. *Microbios*, 23, 92: 83-85

Zhang R., Ma P.X. 1999. Poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. Preparation and morphology. *Journal of material research*, 44, 4: 446-455

Pawlik T.M., Kayomarsi K. 2004. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International journal of radiation oncology biology physics*, 59, 4: 928-942

7.2 DRUGI VIRI

Cell viability. 2013. Promega.

<http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability> (5. feb. 2013)

Logotheris C.J., Lin S-H. Osteoblasts in Prostate Cancer Metastasis to Bone. 2005.

<http://www.medscape.com/viewarticle/496917> (21. mar. 2013)

Freudenrich C. How light microscopes work.

<http://www.howstuffworks.com/light-microscope4.htm> (12. dec. 2012)

Mesenchymal stem cells – the human body pharmacy. Stem Cell Thailand.

<http://stemcellthailand.org/mesenchymal-stem-cells-the-human-body-pharmacy> (13. apr. 2013)

ZAHVALA

Zahvaljujem se podjetju Educell d.o.o., da mi je omogočilo opravljanje praktičnega dela magistrskega dela. Somentorju dr. Lenartu Girandonu izrekam zahvalo za uvajanje v delo s celičnimi kulturami ter za nenehno pomoč in svetovanje pri izdelavi magistrske naloge.

Hvala mentorju prof. dr. Miomirju Kneževiću, recenzentki prof. dr. Damjani Drobne in predsedniku komisije prof. dr. Marku Kreftu.

Dr. Darji Marolt se zahvaljujem za temeljit strokovni pregled magistrskega dela, Barbari Dovgan pa za vso pomoč v laboratoriju.

Zahvaljujem se svoji družini in fantu, da so mi stali ob strani in me vzpodbujali. Staršem hvala tudi za finančno podporo.

Zahvala gre tudi prijateljem, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastajanju tega dela.