

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Petra ERJAVEC

**OPTIMIZACIJA GOJENJA MEZENHIMSKIH
MATIČNIH CELIC IZ MAŠČEVJA NA
MIKRONOSILCIH V MEŠALNEM
BIOREAKTORJU**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Petra ERJAVEC

**OPTIMIZACIJA GOJENJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC
IZ MAŠČEVJA NA MIKRONOSILCIH V MEŠALNEM
BIOREAKTORJU**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**OPTIMIZATION OF CULTIVATION MESENCHYMAL STEM
CELLS FROM ADIPOSE TISSUES ON MICROCARRIERS IN A
STIRRED BIOREACTOR**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je nastalo v okviru podiplomskega študija Strukturne in funkcionalne biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v celičnem laboratoriju Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani, na Oddelku za genško toksikologijo in biologijo raka.

Študijska komisija medoddelčnega podiplomskega študija Strukturne in funkcionalne biologije je na seji dne, 6. 2. 2013, za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Tamaro Lah Turnšek, za somentorico dr. Heleno Motaln in za recenzenta prof. dr. Primoža Rozmana.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof. dr. Boris BULOG
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: prof. dr. Primož ROZMAN
Zavod RS za transfuzijsko medicino
- Član: prof. dr. Tamara LAH TURNŠEK
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genško toksikologijo in biologijo raka
- Član: asist. dr. Helena MOTALN
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genško toksikologijo in biologijo raka

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Petra ERJAVEC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2

DK UDK 6:576.3(043.2)=163.6

KG mezenhimske matične celice/MMC/mezenhimske matične celice iz maščevja/ASC/mikronosilci/MN/bioreaktorski sistemi

AV ERJAVEC, Petra, diplomirana biologija

SA LAH TURNŠEK, Tamara (mentor)/MOTALN, Helena (somentor)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije

LI 2015

IN OPTIMIZACIJA GOJENJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IZ MAŠČEVJA NA MIKRONOSILCIH V MEŠALNEM BIOREKATORJU

TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)

OP XII, 78 str., 16 pregl., 25 sl., 70 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Mezenhimske matične celice (MMC) predstavljajo velik napredek v klinični terapiji za regeneracijo tkiv ali celično terapijo. Zaradi imunosupresivnih lastnosti in multipotentnosti so MMC uporabne pri zdravljenju raznih boleznih in poškodovanih tkiv v regenerativni medicini. Z namenom, da se zagotovijo primerne količine MMC za klinično uporabo, so se kot alternativa klasičnim metodam gojenja v adherentnih enoslojnih plasteh razvili mikronosilci (MN). Slednji predstavljajo tridimenzionalno podporno ogrodje za pritrnitev, nadaljno širjenje in diferenciacijo MMC. Cilj našega magistrskega dela je bil optimizirati pogoje gojenja MMC iz maščevja (ASC) na MN za produkcijo čim večjega števila celic. Z optimizacijo *in vitro* pogojev gojenja ASC smo pokazali, da lahko največje število celic dobimo z izbiro primernih fizikalnih in kemijskih lastnosti MN, s predpripravo MN v gojilnem mediju in s postopkom menjave medija. Celice po gojenju na MN niso izgubile proliferacijskega potenciala v primerjavi s kontrolno adherentno kulturo. Z diferenciacijskimi poskusi pred in po gojenju celic na MN smo pokazali, da sposobnost diferenciacije v adipocite in hondroците ostaja enaka, osteogeni potencial pa je bil nekoliko povečan kot pri kontrolni kulturi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDK 6:576.3(043.2)=163.6

CX mesenchymal stem cells/MSK/mesenchymal stem cells from adipose
tissue/ASC/microcarriers/MC/bioreactor systems

AU ERJAVEC, Petra

AA LAH TURNŠEK, Tamara (supervisor)/MOTALN, Helena (co-advisor)

PP SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in
Structural and Functional Biology

PY 2015

TI OPTIMIZATION OF CULTIVATION MESENCHYMAL STEM CELLS FROM
ADIPOSE TISSUES ON MICROCARRIERS IN A STIRRED BIOREACTOR

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO XII, 78 p., 16 tab., 25 fig., 70 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Mesenchymal stem cells (MSC) represent a major advance in clinical therapy to regenerate tissues or for cell therapy. Due to their immunosuppressive properties and multipotency, show utility in the treatment of various diseases and damaged tissues in regenerative medicine. In order to ensure appropriate quantities of MSC for clinical use, as an alternative methods to conventional cultivation of the adherent monolayer layers developed microcarriers (MC). MC represent a three-dimensional support matrix for attachment, further expansion and differentiation of MSC. The aim of our master's thesis was to optimize the culture conditions of MSC from adipose tissue (ASC) on MC for the high-yield culture of cells. We have shown that the highest number of cells can be obtained by selection of appropriate physical and chemical properties of MC, by preincubation of MC in the culture medium and by the medium refreshment regime. Cells grown on MC did not lose their proliferative potential compared with the control adherent culture. The differentiation experiments before and after the cultivation cells on MC shown that the ability of differentiation into adipocytes and chondrocytes remains the same, but osteogenic potential was slightly increased compared with control cultures.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
SLOVARČEK.....	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE.....	3
2.1.1 Lastnosti MMC.....	4
2.1.2 Uporaba MMC	5
2.1.3 Mezenhimske matične celice iz maščevja (ASC)	6
2.2 MIKRONOSILCI (MN).....	12
2.2.1 Pritrditev in rast celic na MN.....	13
2.2.2 Prednosti MN	15
2.2.3 Komercialni MN	16
2.2.4 MN Cytodex	17
2.2.5 Uporaba MN	19
2.3 BIOREAKTORSKI SISTEMI ZA GOJENJE CELIC.....	24
2.4 OPTIMALNI POGOJI GOJENJA MMC NA MN	26
3 MATERIALI IN METODE	28
3.1 MATERIALI.....	28
3.1.1 Kemikalije	28
3.1.2 Laboratorijska oprema	29
3.2 POTEK DELA	30
3.3 METODE	31
3.3.1 Priprava gojišča za ASC	31
3.3.2 Gojenje ASC v gojilni suspenziji.....	31

3.3.3	Precepljanje celic	32
3.3.4	Zamrzovanje celic.....	32
3.3.5	Priprava MN.....	33
3.3.6	Nasajanje ASC na MN in nadaljno gojenje v mešalnih steklenkah	35
3.3.7	Odstranjevanje celic iz MN in štetje celic s hemocitometrom.....	36
3.3.8	Spremljanje rasti celic na MN.....	38
4	REZULTATI	44
4.1	VPLIV PREDINKUBACIJE MN NA RAST IN KONČNO ŠTEVILO CELIC ..	44
4.2	VPLIV POGOSTOSTI MENJAVE MEDIJA NA KONČNO ŠTEVILO CELIC	50
4.3	TESTIRANJE PROLIFERACIJSKEGA POTENCIALA CELIC PO GOJENJU NA MN.....	56
4.4	TESTIRANJE DIFERENCIACIJSKEGA POTENCIALA PRED IN PO GOJENJU CELIC NA MN	57
5	RAZPRAVA.....	63
6	SKLEPI	69
7	POVZETEK.....	71
8	VIRI.....	72
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 1: Multipotentni potencial MMC (Nombela-Arrieta in sod., 2011).....	4
Slika 2: Diferenciacijski potencial MMC iz maščevja (Meirelles in Nardi, 2009).....	9
Slika 3: Shematski prikaz izolacije MMC iz maščevja za uporabo v terapevtske namene (prirejeno po Locke in sod., 2009).....	11
Slika 4: Mikroskopski prikaz štirih glavnih korakov pritrditve celic na podlago (GE Healthcare, 2013).....	13
Slika 5: Shematski prikaz pritrditve celične kulture na sferično oblikovane MN (prirejeno iz Biotechnology and Bioengineering, 2013).....	14
Slika 6: Shematski prikaz zgradbe MN <i>Cytodex-1</i> (GE Healthcare, 2013).	18
Slika 7: Shematski prikaz zgradbe MN <i>Cytodex-3</i> (GE Healthcare, 2013).	19
Slika 8: Mešalne steklenke z različno oblikovanimi magnetnimi mešalnimi palčkami (GE Healthcare, 2013; Gebb in sod., 1984).....	24
Slika 9: Prikaz gojenja ASC na MN v gojilni suspenziji na mešalni plošči.....	36
Slika 10: Primerjava vpliva predinkubacije <i>Cytodex-1</i> v gojilnem mediju DMEM z 20 % FBS (GM) in čistem FBS.....	44
Slika 11: Primerjava vpliva predinkubacije <i>Cytodex-3</i> v gojilnem mediju DMEM z 20 % FBS (GM) in čistem FBS.....	45
Slika 12: Primerjava rasti celic na mikronosilcih (MN) med <i>Cytodex-1</i> in <i>Cytodex-3</i>	45
Slika 13: Rast celične linije ASC K16 (p8) na <i>Cytodex-1</i> pri predinkubaciji MN v A) GM in B) FBS.	48
Slika 14: Rast celične linije ASC K16 (p8) na <i>Cytodex-3</i> pri predinkubaciji MN v A) GM in B) FBS.	49
Slika 15: Primerjava rasti ASC na <i>Cytodex-1</i> pri menjavi GM vsaka 2 dni in vsake 3 dni.....	50
Slika 16: Primerjava rasti ASC na <i>Cytodex-3</i> pri menjavi GM vsaka 2 dni in vsake 3 dni.....	51

Slika 17: Prikaz rasti ASC k16 (p8) na MN <i>Cytodex-1</i> po menjavi medija A) vsaka 2 dni in B) vsake 3 dni	54
Slika 18: C) Prikaz rasti ASC k16 (p8) na MN <i>Cytodex-3</i> po menjavi medija C) vsaka 2 dni in D) vsake 3 dni	55
Slika 19: Proliferacijski potencial celic po gojenju na MN v primerjavi z rastjo celic pred gojenjem na MN	56
Slika 20 in 21: A) Indukcija adipogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 7 pred gojenjem na MN; B) Indukcija adipogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 8 po gojenju na MN.	58
Slika 22 in 23: A) Indukcija osteogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 7 pred gojenjem na MN; B) Indukcija osteogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 8 po gojenju na MN.	60
Slika 24 in 25: A) Indukcija hondrogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 7 pred gojenjem na MN; B) Indukcija hondrogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 8 po gojenju na MN.	62

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2D	Dvodimenzionalnost
3D	Trodimenzionalnost
ASC	Mezenhimska matična celica iz maščevja (angl. Adipose derived Stem Cell)
BHK celice	Celice ledvic mladega hrčka (angl. Baby Hamster Kidney cells)
CD34	Celični označevalec pripadnosti (angl. Cluster of Differentiation)
CFU	Osnovna enota za oblikovanje kolonij (Colony Forming Unit)
CHO celice	Celice iz ovarija kitajskega hrčka (angl. Chinese Hamster Ovary cells)
DEAE	Dietilaminoetil (angl. Diethylaminoethyl)
DMEM	Dulbeccovo modificirano celično gojišče (angl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimetilsulfoksid
dO ₂	Količina kisika, ki ga prejme telo iz pljuč
ECM	Zunajcelični matriks (angl. Extracellular matrix)
EGF	Epidermalni rastni faktor (angl. Epidermal Growth Factor)
ERK 1/2	Kinaza regulirana z zunajceličnimi signali (angl. Extracellular signal-Regulated Kinases)
ESC	Embrionalne matične celice (angl. Embryonic Stem Cells)
FBS	Serum govejega zarodka (angl. Fetal Bovine Serum)
FGF, FGF-2, bFGF	Družina fibroblastnih rastnih faktorjev (angl. Fibroblast Growth Factor family)
G	Relativna centrifugalna sila - RCF (angl. Relative Centrifugal Force)
Gln	Glutamin
GM	Gojilni medij DMEM z 20 % FBS
HLA (I in II)	Humani levkocitni antigen (HLA)

IGF-1	Hormonski rastni faktor podoben inzulinu (angl. Insulin-like Growth Factor)
IL-6, IL-8	Interlevkini
iPSC	Inducirane pluripotentne matične celice (angl. Induced Pluripotent Stem Cells)
MMC	Mezenhimska matična celica (angl. Mesenchymal Stem Cell)
MN	Mikronosilci (angl. Microcarriers)
N-CAM	Adhezijske molekule nevronskih celic (angl. Neural Cell Adhesion Molecule)
NSO celice	Celična linija iz mieloma miši
O ₂	Molekularni kisik
PBS	Fosfatni pufer (angl. Phosphate Buffered Saline)
PDGF	Rastni faktor iz krvnih ploščic (angl. Platelet derived Growth Factor)
pH	Merilo za koncentracijo hidroksilnih ionov v raztopini
pO ₂	Parciarni tlak molekule kisika
Rpm	Število vrtljajev na minuto (angl. Revolutions Per Minute)
SVF	Stromalna vaskularna frakcija
T25 in T75	Gojilna posoda s površino 25 cm ² in 75 cm ²
TGF-β	Transformirajoči rastni dejavnik beta (angl. Transforming Growth Factor beta)
TNF-α	Faktor tumorske nekroze α (angl. Tumor Necrosis Factor α)

SLOVARČEK

Pojem	Razlaga
Adherentna kultura	Celična kultura sposobna pritrditve na dno gojilne posode.
Alogensko/alogeno*	Istovrstno. Tkivo, celice ali organ drugega osebkta iste biološke vrste, ki je genetsko različen in zato imunsko neskladen. »Alogenska uporaba« je uporaba tkiv ali celic, ki jih odvzamemo eni osebi in uporabimo pri drugi osebi.
Apoptoza	Programirana celična smrt, normalen, uravnavan razvojni in fiziološki proces.
Avtologno *	Tkivo, celice ali organ, ki jih presadimo istemu osebkku, ki jih je daroval. »Avtologna uporaba« je uporaba tkiv ali celic, ki jih odvzamemo in uporabimo pri isti osebi.
Bioreaktor	Umeten sistem, v katerem potekajo biološki procesi, s katerim lahko pridobimo človeku uporabne snovi.
Diferenciacija	Sposobnost celic, da se iz manj specializiranih celic razvijejo v bolj specializirane.
Imunofenotip	Imunološki označevalci na površini celice, ki jih lahko določimo z imunocitokemičnimi reakcijami.
<i>In vitro</i>	Izraz, ki se nanaša na procese in poskuse, ki potekajo v nadzorovanem okolju zunaj živega organizma.
<i>In vivo</i>	Izraz, ki se nanaša na procese, ki potekajo znotraj živega organizma.
Konfluenca	Stanje, ko celice v enoslojni kulturi popolnoma prerastejo dno gojilne posode.
Krvotvorna matična celice *	Multipotentna matična celica, iz katere nastanejo eritrociti, levkociti in trombociti.

Matična celica *	Nediferencirana celica, ki ima sposobnost samoobnavljanja. Z nesimetrično delitvijo nastane ena njej enaka hčerinska celica in druga bolj diferencirana hčerinska celica. Ta ima manjši razvojni potencial, ker je bolj diferencirana.
Mezenhimska matična celica *	Multipotentna matična celica, ki se lahko diferencira v celice hrustanca, kosti, mišice in maščobne celice. Nahaja se tudi v kostnem mozgu, ki je vir mnogih matičnih celic.
Nekroza	Za razliko od apoptoze je nekroza patološka celična smrt, ki privede do vnetnega procesa v celici. Če je omejena na tkivo, privede do lokalnega odmrtja tkiva.
Pasaža	Presaditev celic v celični kulturi v novo gojilno posodo, ponavadi po tem ko celice v kulturi dosežejo konfluentno stanje.
Podvojitveni čas celic	V kolikem času se število celic v celični kulturi podvoji.
Proliferacija	Povečanje števila celic s procesom celične delitve.
Senescenca	Proces staranja celic. S časom se zmanjša stopnja delitve celic, zmanjšano je kopičenje metabolnih produktov, kar na koncu pripelje do celične smrti.
Stopnja povečanja celične populacije	Za koliko krat se število celic v celični kulturi poveča v času.
Transdiferenciacija	Naraven pojav matičnih celic, kjer se matične celice iz enega tkiva odraslega osebka spremenijo v specializirane celice drugega tkiva.
Tripsinizacija *	Encimatska razgradnja proteinov s serinsko proteazo tripsinom. V celičnih kulturah se uporablja pri ločevanju celic od podlage.

* Rožman in Jež, 2009

1 UVOD

Mezenhimske matične celice (MMC; angl. Mesenchymal stem cells) so odrasle matične celice, ki se nahajajo v različnih tkivih, kot so kostni mozeg, maščevje, popkovnična kri, horionski vili placent, amnijska membrana ipd. Kot glavni vir MMC je bil dolgo uveljavljen kostni mozeg. Zaradi lažjega dostopa je vedno bolj kot alternativni vir pridobivanja MMC v uporabi tudi maščevje. Iz maščevja lahko pridobimo večje količine izhodiščnega materiala in nato namnožimo večje število celic. Mezenhimske matične celice iz maščevja (ASC; angl. Adipose-derived stem cells) se lahko diferencirajo v različne vrste celic, med drugimi v maščobne, kostne in hrustančne celice. Pomembna lastnost MMC je njihova sposobnost samoobnavljanja in regeneracije poškodovanega tkiva ter njihovo protivnetno in imuno-modulatorno delovanje. Tako se uspešno uporabljajo pri alogenskih transplantacijah in predstavljajo velik potencial pri zdravljenju različnih bolezni. V ta namen je potrebno zagotoviti zadostno količino MMC primerne kakovosti. Klasično gojenje MMC se izvaja v adherentnih enoslojnih plasteh, ki predstavljajo 2D okolje. Takšen proces gojenja ima mnoge pomanjkljivosti, predvsem je dolgotrajen, težje ga je spremljati ter nadzorovati, kar poveča dovzetnost za kontaminacije. Kot delovno intenziven proces je povezan z visokimi stroški in majhnim številom dobljenih celic glede na površino. Vse te pomanjkljivosti lahko zaobidemo z gojenjem celic na mikronosilcih (MN), ki predstavljajo izboljššan, nadzorovan in stroškovno učinkovit 3D način gojenja. MN omogočajo povečanje razmerja gojilne površine in prostornine, potrebno pa je dodatno optimizirati pogoje gojenja.

1.1 NAMEN DELA

Zaradi potrebe po večjih količinah MMC se bomo v magistrskem delu usmerili v optimizacijo pogojev gojenja ASC na MN v gojilni suspenziji. Skušali bomo določiti ključne parametre gojenja, kot so ustrezna priprava MN glede na njihove fizikalne in kemijske lastnosti, režim menjave medija, ustrezni pogoji mešanja v gojilni suspenziji. S tem bomo omogočili pridobivanje največjega možnega števila celic za terapevtsko uporabo.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V magistrski nalogi smo si zastavili naslednje hipoteze:

- Predinkubacija MN v serumu govejega zarodka (čisti FBS) vpliva na izboljšano rast in končno število ASC v primerjavi s predinkubacijo MN v gojilnem mediju DMEM z 20 % FBS (GM).
- Pogostejša menjava GM poveča proliferacijo in število pridobljenih celic.
- ASC po gojenju na MN v gojilni suspenziji ohranijo enak proliferacijski potencial, kot ga imajo celice v adherentni enoslojni plasti.
- Gojenje ASC na MN ne vpliva na njihovo diferenciacijsko sposobnost.

2 PREGLED OBJAV

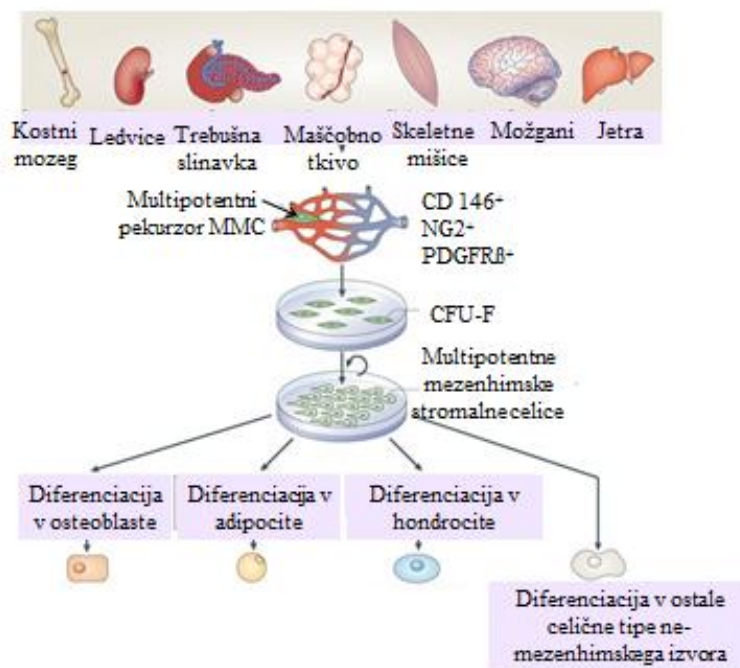
2.1 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE

Mezenhimske matične celice (MMC; angl. Mesenchymal stem cells) uvrščamo v skupino odraslih matičnih celic, ki imajo multipotentni značaj (Jiang in sod., 2002). Za multipotentne matične celice je značilno, da so se sposobne diferencirati v različne, vendar sorodne vrste celic (Schöler, 2007). Poleg MMC v skupino odraslih matičnih celic z multipotentnim potencialom spadajo tudi krvotvorne matične celice (hSC, angl. Hematopoietic stem cells), iz katerih nastanejo vse krvne celice in celice imunskega sistema, ki se nahajajo v več organih (Schöler, 2007).

V širšo skupino matičnih celic s pluripotentnim potencialom spadajo embrionalne matične celice (ESC; angl. Embryonic stem cells) in inducirane pluripotentne matične celice (iPSC; angl. Induced pluripotent stem cells). Slednje imajo večji terapevtski potencial v primerjavi z odraslimi MMC. Njihova praktična uporaba pa je precej bolj omejena, tako iz etičnega kot tudi iz zdravstvenega vidika. Embrionalne matične celice so se namreč sposobne diferencirati v celične linije vseh zarodnih plasti. Pri njihovi uporabi to lahko privede do negativnih stranskih učinkov, kot so nastanek neželenega tkiva ali tvorbe teratomov (Mizuno in sod., 2012). V nasprotju z njimi so MMC bolj imuno-kompatibilne in etično ne sporne. Pospešeno se uporabljajo tako v regenerativni medicini kot za številne druge terapevtske namene.

MMC so prisotne v vseh tkivih (Dominici in sod., 2006). Učinkovitost izolacije in število izoliranih celic je odvisno od vrste tkiva, starosti osebkov in postopka izolacije (Motaln in sod., 2010). Prvotno so bile izolirane iz aspiratov kostnega mozga. Danes lahko zadostno količino MMC izoliramo tudi iz drugih tkiv, kot so maščevje, popkovina in amnionska membrana (Fangming, 2012). Po izolaciji celic iz različnih tkiv dobimo najprej heterogeno populacijo celic, sestavljeno iz progenitorskih mezenhimskih matičnih celic, mezenhimskih stromalnih celic in fibroblastov. MMC se od ostalih celic razlikujejo po sposobnosti pritrditve na gojilno površino in razrasta v obliki celične

kolonije (CFU; angl. Colony-forming unit) (Akiyama in sod., 2012). Z adherentnim gojenjem in nadaljnim presajanjem v nove gojilne posode postopoma dobimo čiste kulture teh celic. Te so sposobne nadaljne diferenciacije v specifične celične linije.



Slika 1: Multipotentni potencial MMC. Celice so po izolaciji iz različnih tkiv ali organov sposobne pritrditve na gojilno površino in oblikovanja celičnih kolonij.

Lahko se tudi diferencirajo v različne celične linije

(Nombela-Arrieta in sod., 2011).

Poimenovanje MMC se nanaša na njihov izvor. Poleg MMC imajo enak izvor tudi krvotvorne matične celice (hSC), zato njihovo poimenovanje predstavlja precejšen izziv, kadar želimo celice specifično ločiti od izvornih hSC. Glede na njihove specifične lastnosti mnogi avtorji predlagajo alternativno poimenovanje »mezenhimske progenitorske celice« ali »ne-krvotvorne mezenhimske matične celice« (Nardi in Meirelles, 2006). MMC, ki jih izoliramo iz specifičnih organov, poimenujemo glede na njihov izvorni organ, npr. MMC iz maščevja (ASC; angl. Adipose-derived stem cells) (Nardi in Meirelles, 2006).

2.1.1 Lastnosti MMC

Po uspešni izolaciji MMC iz številnih tkiv se je uporaba celic usmerila predvsem v celično terapijo. Pri tem je bilo ključnega pomena opredeliti tako njihov fenotipski kot diferenciacijski značaj in jih ločiti od ostalih matičnih celic. Ker MMC na svoji površini nimajo unikatnega markerja, je Mednarodno društvo za celično terapijo (angl. International Society for Cellular Therapy) objavilo kriterije, s katerimi si lahko pomagamo pri opredelitvi teh celic. Prvi kriterij, ki opredeljuje MMC, je sposobnost pritrditve na plastično podlago v gojilni posodi. Hitro identifikacijo celične populacije omogoča tudi izražanje specifičnih površinskih antigenov. MMC morajo v vsaj 95 % izražati specifične mezenhimске označevalce CD105, CD73 in CD90. Ne smejo izražati krvotvornih in endotelijskih označevalcev (< 2 %) CD45, CD34, CD14 ali CD11b, CD79 α ali CD19 in HLA-DR. Kot zadnji kriterij opredelitve MMC je njihov diferenciacijski potencial. Sposobne morajo biti diferenciacije *in vitro* v vsaj tri celične linije – v osteoblaste, hodroците in adipocite (Dominici in sod., 2006).

Poleg diferenciacije v tri glavne celične linije, ki dokazuje multipotentni značaj celic, so se po poročanju nekaterih raziskovalcev, MMC sposobne diferencirati tudi v celice nezodermalnega izvora. Sposobnost MMC, da se lahko diferencirajo v celice nezvornih organov se imenuje plastičnost. Plastičnost je sposobnost trans-diferenciacije matičnih celic specifičnega organa v ne le celice izvornega organa, ampak tudi v celice drugih organov. Tako se lahko na primer MMC diferencirajo v miočlaste, kardiomiocite ali celo nevrone (Lakshmiopathy in Verfaillie, 2005).

2.1.2 Uporaba MMC

MMC se zaradi sposobnosti diferenciacije v različne celične vrste pospešeno uporabljajo v medicini. Klinično se alogenske MMC najpogosteje uporabljajo za zdravljenje poškodovanih tkiv. Poškodbe tkiva, kot so hipoksija, ishemija ali nekroza, povzročijo aktivacijo MMC skupaj z ostalimi mediatorji, ki so povezani s poškodbo tkiva (Patel in Genovese, 2011). Celice po aktivaciji migrirajo na poškodovano mesto v

tkivu, kjer stopijo v stik z drugimi celicami. Pričneje izločati pomembne bioaktivne molekule, ki spremenijo redoks potencial v tkivu. To privede do apoptoze celic, stimulirajo se celice, ki popravijo poškodbe in regulirajo lokalni imunski odziv. MMC sodelujejo pri popravilu poškodbe tkiva na dva načina. Lahko nadomestijo poškodovane celice ali z izločanjem bioaktivnih molekul omogočijo aktivacijo celic imunskega sistema (Genovese in sod., 2009). MMC se uspešno uporabljajo tudi pri transplantacijah. Zaradi njihove diferenciacijske sposobnosti se lahko MMC po transplantaciji v kostno tkivo razvijejo v osteoblaste, kar vodi do hitrejšega razvoja kosti in zmanjšane možnosti zlomov (Horwitz in sod., 1999, Horwitz in sod., 2002). Nadaljna uporaba MMC za celično terapijo je usmerjena v zdravljenje številnih genetskih, nevroloških ali skeletnih motenj, kot je npr. metakromatska levkodistrofija ali Hurlerjev sindrom (Koç in sod., 2002). Trenutno je v fazi III kliničnega preizkušanja zdravilo Prohimal (angl. *Prochymal*), ki temelji na MMC izoliranih iz kostnega mozga zdravega odraslega človeka. Namenjeno je za zdravljenje bolezni, kot so kronova bolezen (Duijvestein in sod., 2010) ali akutna bolezen zavrnitve presajenih organov (Herrmann in sod., 2012; Kuzmina in sod., 2012). Poleg uporabe v celični terapiji kažejo MMC velik potencial tudi pri zdravljenju miokardialnih poškodb. Njihova prednost je v imunomodulatornem delovanju, kar zmanjša tveganje za nastanek vnetij ali drugih poškodb (Frantz in sod., 2009). Poleg regeneracije poškodb srca je uporaba teh celic usmerjana tudi v regeneracijo hrustanca (Chen in sod., 2013), v regeneracijo sklepnega hrustanca (Wakitani in sod., 2002), za zdravljenje osteoartritisa ali za zdravljenje bolezni kosti, kot je npr. osteogenesis imperfecta (Horwitz in sod., 1999).

2.1.3 Mezenhimske matične celice iz maščevja (ASC)

Eden izmed pomembnih virov MMC je poleg kostnega mozga tudi maščevje. Zaradi lažjega dostopa se pospešeno uporablja pri izolaciji ASC.

V našem telesu obstaja pet različnih vrst maščevja, in sicer maščevje v kostnem mozgu, mlečno, mehansko, rjavo in belo maščevje. Vsak tip ima tudi svojo biološko funkcijo. Maščevje v kostnem mozgu igra tako pasivno kot aktivno vlogo. Služi kot zaloga

energije in je vir citokinov, ki so potrebni pri procesih hematopoeze ali osteogeneze. Mlečno maščevje zagotavlja hranila in energijo med dojenjem in je regulirano s hormoni, ki se sproščajo med nosečnostjo. Mehansko maščevje zagotavlja podporo za različne kritične telesne strukture, kot so oči ali dlani. Rjavo maščevje je termogeno in ustvarja toploto z izražanjem proteina termogenina, ki vpliva na pH gradient v mitohondrijih. Znatno delež rjavega maščevja najdemo pri novorojenčkih okoli glavnih organov, kot so srce, aorta, ledvice in spolne žleze, kjer je njegova glavna naloga tvorba toplote. Pri odraslih se količina rjavega maščevja zaradi povečane tvorbe toplote iz bazalnega metabolizma med razvojem zmanjšuje (Nedergaard in sod., 2007). Belo maščevje služi za shranjevanje energije in omogoča toplotno izolacijo (Gimble in sod., 2007). Pri ljudeh dobimo ASC iz belega maščevja iz različnih delov telesa. V eni izmed študij so pokazali, da je največ celic mogoče pridobiti iz trebušne maščobe. Za odvzem maščevja je bolj primeren zgornji del telesa v primerjavi s spodnjim delom telesa (Stocchero I. N. in Stocchero G. F., 2011).

ASC imajo številne prednosti v primerjavi z ostalimi MMC. Iz maščobe lahko pridobimo večje število predniških celic kot iz kostnega mozga (Kern in sod., 2006). Kirurški postopek pridobivanja maščevja je manj invaziven. ASC se tako morfološko kot imuno-fenotipsko ne razlikujejo z MMC iz kostnega mozga ali popkovnice. Kažejo celo večji terapevtski učinek v primerjavi z ostalimi viri MMC (Hayato in sod., 2014). ASC so bile v primerjavi z MMC iz kostnega mozga uspešnejše pri zdravljenju poškodb hrbtenjače (Zhou in sod., 2013) in celjenju ran (Liu in sod., 2013). Pomembna prednost ASC je tudi izrazitejši imunomodulatorni učinek (Keyser in sod., 2007). Celice lahko izražajo številne molekule kot so interlevkini (IL-1 RA, IL-6, IL-8), različne rastne dejavnike, kemoatraktivni monocitni protein-1, dejavnike, ki spodbudijo tvorbo granulocitih kolonij kot tudi dejavnike za tvorbo kolonij med granulociti in makrofagi. Te molekule so izražene v večjem obsegu, kot jih lahko izrazijo MMC iz kostnega mozga ali normalni fibroblasti (Keyser in sod., 2007). Tako MMC iz kostnega mozga kot tudi ASC lahko uporabimo za alogenske presaditve celic, kjer ne pride do imunskega odziva. Razlog za to je, da MMC izražajo molekule imunskega sistema HLA-I in ne izražajo molekul HLA-II. Prav tako ne izražajo stimulatornih molekul, kot so CD80, CD86 in CD40 (Keyser in sod., 2007). S tem so celice zaščitene in jih

imunski sistem ne prepozna kot tuje (Le Blanc in Ringdén, 2007). Seveda pa so potrebne še dodatne raziskave na tem področju.

Preglednica 1: Specifični imuno-fenotipski označevalci za MMC iz maščevja
(Gimble in sod., 2007).

Kategorija označevalca	Prisotni površinski označevalci	Odsotni površinski označevalci
Adhezijske molekule	CD9 (tetraspan) CD29 (β_1 integrin) CD49 (α_4 integrin) CD54 (ICAM-1) CD105 (endoglin) CD166 (ALCAM)	CD11b (α_b integrin) CD18 (β_2 integrin) CD50 (ICAM-3) CD56 (NCAM) CD62 (E-selektin) CD104 (α_4 integrin)
Receptorske molekule	CD44 (hialuronat) CD71 (transferin)	CD16 (Fc receptor)
Encimi	CD10 (antigen akutne limfocitne levkemije) CD13 (aminopeptidaza) CD73 (5' ekto-nukleotidaza) Aldehid dehidrogenaza	
Molekule ECM	CD90 (Thy1) CD146 (Muc18) Kolagen tipa I in II Osteopontin, osteonektin	
Citoskelet	α -gladko-mišični aktin, vimentin	
Krvotvorni		CD14, CD31, CD45
Komplement	CD55, CD59 (protektin)	
Histokompatibilni antigeni	HLA-ABC	HLA-DR
Značilni za matične celice	CD34, ABCG2	
Stromalni	CD29, CD44, CD73, CD90, CD166	

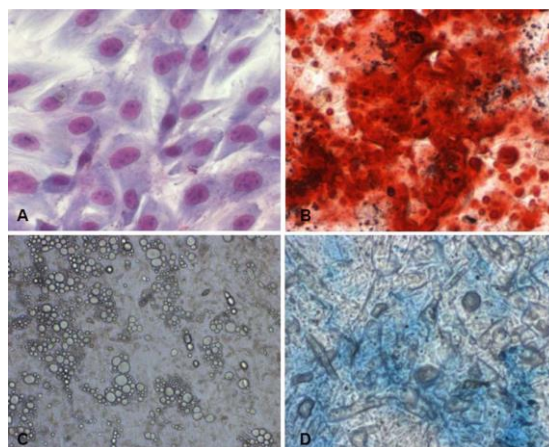
2.1.1.1 Diferenciacija ASC

Sposobnost diferenciacije v adipocite, hondrocite in osteocite je eden izmed ključnih kriterijev, ki definirajo populacijo MMC. Multipotentni diferencijski značaj celic s starostjo donorja upada. Kljub temu zadnje študije kažejo, da ASC ohranijo adipogeni potencial tudi v višji starosti donorja (< 60 let), medtem ko osteogeni in hondrogeni potenciala signifikantno upade (Choudhery in sod., 2014).

V *in vitro* pogojih lahko celice induciramo v poljubne celične linije z ustreznimi citokini in rastnimi dejavniki. Specifični diferencijski označevalci MMC so fibroblastni rastni faktor beta (β -FGF; angl. Fibroblast growth factor beta), transformirajoči rastni faktor

beta (TGF- β ; angl. Transforming growth factor beta) in rastni faktor iz krvnih ploščic (PDGF; angl. Plateled-derived growth factor) (Ng in sod, 2008).

MMC se najlažje diferencirajo v celice originalnega tkiva. Tako se matične celice iz maščevja in kostnega mozga najlažje diferencirajo v adipocite in osteocite. Težje se diferencirajo v celice hrustančnega tkiva (hondrocite) (Kern in sod., 2006). Nasprotno pa se matične celice iz popkovnične krvi težje diferencirajo v adipocite (Kern in sod., 2006).



Slika 2: Diferencijski potencial MMC iz maščevja. A) Nediferencirana adherentna celična kultura, barvana z Giemsa barvilom; B) Osteogena diferenciacija po barvanju z *Alizarin Red*; C) Adipogena diferenciacija z fazno-contrastno sliko; D) Hondrogena diferenciacija po barvanju z *Alcian Blue* (100 x povečava) (Meirelles in Nardi, 2009).

2.1.1.2 Proliferacija ASC

Na proliferacijski potencial ASC vpliva tako starost donorja kot vrsta tkiva. Pri uporabi teh celic v terapevtske namene je pomembno, da imajo celice sposobnost dolgotrajnega gojenja in rasti kot tudi nizko stopnjo senescence. S starostjo donorja se proliferacijski potencial zmanjšuje, povečuje pa se stopnja senescence (Jin Jin in sod., 2013). V ta namen so glede visokega proliferacijskega potenciala in nizke stopnje izražanja s senescenco povezanih proteinov najbolj primerne celice iz popkovine. Število izoliranih celic je močno odvisno od samega postopka izolacije, zato te niso vedno možne za

terapevtsko uporabo (Kern in sod., 2006). ASC vsebujejo v primerjavi z MMC iz kostnega mozga večje število progenitorskih celic (Kern in sod., 2006). Ostale proliferacijske lastnosti so odvisne tudi od *in vitro* gojenja. V *in vitro* pogojih se celice običajno goji v okolju s 5 % O₂, kar za celice predstavlja normoksične pogoje. Zmanjšan delež kisika (hipoksično okolje) lahko poveča proliferacijski potencial celic (Grayson in sod., 2007). Proliferacijski potencial ASC je v *in vitro* pogojih mogoče stimulirati tudi z dodajanjem rastnih faktorjev (npr. FGF-2, EGF, IGF-1 ali TNF- α , ipd.) v gojilni medij celic. Kadar celice gojimo dlje časa, je za izboljšano rast in zmožnosti samo-obnove celic priporočljivo dodati rastni faktor EGF-2, ki deluje preko zunaj celičnih ERK 1/2 signalnih poti (Mizuno in sod., 2012).

2.1.1.3 Izolacija ASC

Vzorec maščevja za izolacijo progenitorskih celic se pridobi iz posegov liposukcije. Maščoba se med posegom liposukcije funkcionalno popolnoma ohrani, prav tako je izkoristek celic v primerjavi z ostalimi viri MMC zelo visok (Preglednica 2).

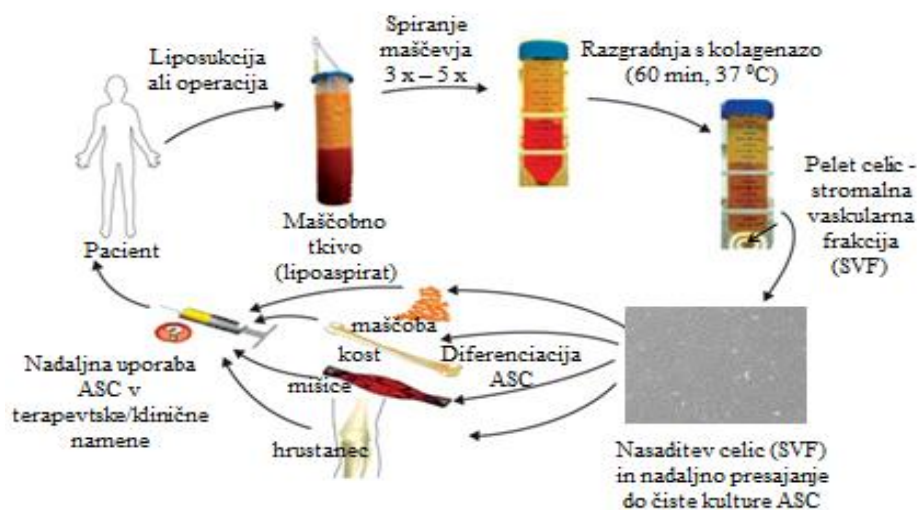
Preglednica 2: Številčnost MMC glede na različen vir donorja. CFU predstavlja osnovno enoto in ponazarja sposobnost oblikovanja celične kolonije (Stocchero I. N. in Stocchero G. F., 2011).

Vir ASC	Popkovina	Kostni mozeg	Liposukcijska maščoba	Rezina maščobega tkiva
Donos	200 - 20.000 CFU/g	100 - 1.000 CFU/g	3.600 - 10.700 CFU/g	28.000 CFU/g

Izolacija ASC iz lipoaspirata poteka tako, da plastični kirurg med posegom liposukcije s kanilo prepoji podkožno tkivo s fiziološko tekočino. Fiziološka tekočina vsebuje anestetik in/ali epinefrin. S pomočjo sesala nato odstranijo tako tekočino kot koščke tkiva (Illouz, 1983). Nastanejo drobni fragmenti tkiva, katerih velikost je odvisna od dimenzij kanile. Izolirani fragmenti tkiva vsebujejo stromalno vaskularno frakcijo (SVF; angl. Stromal vacular fraction). SVF je sestavljena iz heterogene populacije krvnih celic, fibroblastov, pericit, endotelnih celic in »preadipocit« oziroma predniških celic adipocitov (Rodbell in Jones, 1966) kot tudi iz adherentnih stromalnih celic, ki imajo značilnosti predniških adipocit. Adherentne stromalne celice se poleg v SVF

nahajajo tudi neposredno v liposukcijski aspiracijski tekočini (Yoshimura in sod., 2006). Kadar se liposukcija izvaja z ultrazvokom, lahko le-ta vpliva na zmanjšano število pridobljenih celic iz vzorcev maščevja (Yoshimura in sod., 2006). Optimalen izkoristek celic se lahko kasneje izboljša s spreminjanjem hitrosti centrifugiranja (Kurita in sod., 2008).

Postopek izolacije ASC vključuje najprej spiranje lipoaspirata, da odstranimo krvne celice. Če so prisotni večji fragmenti tkiva, jih je potrebno razrezati na manjše koščke. Nato se doda encim kolagenaza, ki omogoči razgradnjo tkiva, s centrifugiranjem pa se loči SVF od zrelih adipocit. SVF je v obliki peleta, katerega se lahko dodatno resuspendira v pufru za razgradnjo krvnih celic. Zadnji korak vključuje nasaditev celic v gojilne posode. Ob 70-90 % konfluenci celic sledi nadaljno presajanje, dokler ne dobimo čiste kulture ASC. ASC imajo zmožnost pritrditve na dno posode po čemer se jih loči od ostalih celic (protokol po Gimble in sod., 2007).



Slika 3: Shematski prikaz izolacije MMC iz maščevja za uporabo v terapevtske namene (prirejeno po Locke in sod., 2009).

2.2 MIKRONOSILCI (MN)

Študije s pomočjo celičnih kultur so do sedaj postale nenadomestljiv pripomoček za mnoge raziskovalce. Predstavljajo odličen *in vitro* model za preučevanje strukture, funkcije in diferenciacije živalskih celic (GE Healthcare, 2013). Biotehnološka in farmacevtska industrija uporablja celične kulture za produkcijo številnih bioloških materialov, kot so zdravila, encimi, hormoni, protitelesa, nukleinske kisline ipd. Pri tem je v prvi vrsti glavni cilj pridobiti največje možno število celic. V ta namen so raziskovalci začeli iskati alternativne možnosti gojenja živalskih celičnih linij. Ideja o gojenju pritrjenih živalskih celic na majhnih ogrodjih sferičnih oblik, se je prvič porodila raziskovalcu van Wezel-u. Ta je v svojem eksperimentu prvi uporabil mikronosilec (MN; angl. Microcarriers), DEAE Sephadex™ A-50 (Van Wezel, 1967). Pokazal je, da bi takšen homogen sistem lahko predstavljal rešitev za gojenje in proizvodnjo velikega števila celic pri pritrjenih živalskih celičnih linijah.

Gojenje in rast celic na prvih MN pa kljub izboljšani metodi ni potekalo brez težav. Ob odkritju MN je veljalo prepričanje, da je gostota pritrjenih celic odvisna od rastne površine MN. To bi vodilo do sorazmernosti maksimalne celične gostote in površine MN. Teorija se je v praksi izkazala za napačno. V prvem poskusu je van Wezel uporabil DEAE Sephadex A-50 pri koncentraciji 1 mg/ml. Če je povečal koncentracijo MN, se je pri celicah pojavila toksičnost, ki ni bila sorazmerna s povečano gostoto celic. Toksičnost je definiriral z umrljivostjo celic v zgodnji fazi gojenja, dolgi lag fazi in zmanjšani gostoti celic v eksponentni fazi rasti (GE Healthcare, 2013). Kasneje so odkrili, da je bil vzrok za neuspešno rast celic pri višji koncentraciji MN, povečana kapaciteta ionske izmenjave DEAE skupin v mikro-okolju celice in ne skupna kapaciteta izmenjanih ionov v kulturi. Prav tako je potrebno upoštevati dejstvo, da začetni poskusi niso bili kontrolirani in optimizirani. Nadgradnja prvotnega MN vključuje nižjo stopnjo zamenjave pozitivno nabitih DEAE skupin in optimizacijo parametrov, ki izboljšajo celično rast. Tako so do sedaj uspešno razvili MN, ki so primerni za rast različnih vrst celic.

2.2.1 Pritrditev in rast celic na MN

Celice v 2D kulturi rastejo v monosloju, kjer so se zaradi specifične sestave površinskih glikoproteinov zmožne pritrđiti na podlago in tvoriti enoslojno kulturo (GE Healthcare, 2013). Da bi lahko enake celične kulture gojili tudi na MN, je pomembno, da imajo tudi vse potrebne lastnosti, ki omogočajo tako pritrđitev kot rast celic. Pritrditev celic na gojilno površino lahko razdelimo v 4 ključne korake. V prvem koraku se elementi zunajceličnega matriksa (ECM) pritrđijo na površino, kjer tvorijo vezi z transmembranskimi adhezijskimi receptorji. Povezava elementov ECM z receptorji omogoči rahlo vezavo celic na površino MN. V drugem koraku so celice že nekoliko bolj sploščene, vendar še vedno sferoidnih oblik. Celice preidejo v kontakt s podlago, poveča se stična površina in gostota vezi. V tretjem koraku se celice pritrđijo na površino. Zadnji korak predstavlja popolnoma pritrđene celice, ploščatih oblik, ki se začnejo širiti po podlagi (Grinnell, 1978; GE Healthcare, 2013).



Slika 4: Mikroskopski prikaz štirih glavnih korakov pritrđitve celic na podlago (GE Healthcare, 2013).

Pritrditev celic je v prvi vrsti odvisna od komponent ECM (kolagen tipa I in IV, fibronektin, vibronektin, laminin itd.), ki se povežejo z adhezijskimi receptorji (kadherini, integrini in N-CAM) (Grinnell, 1978). Vezava proteinov ECM z receptorji izzove spremembo konformacije v citoplazemski domeni receptorja, kar povzroči agregacijo receptorjev. Prosti receptorji, ki so ostali, difundirajo bližje do površine substrata. Tam je kontaktno območje, kjer tvorijo povezave s komponentami ECM. S tem se povečuje velikost kontaktne površine (tretji korak). Celice se začnejo širiti po podlagi, pri tem pa se prerazporedijo mikrotubuli, aktinski filamenti in ligandi, ki so vezani na adhezijske receptorje. Za rast pritrđenih celic v *in vitro* pogojih so potrebne točno določene količine ustreznih proteinov, ki omogočajo pritrđitev celic in nato nadaljno širjenje. Omenjene zahteve se lahko doseže z dodajanjem seruma v gojilni

medij. Druga možnost je, da rastne površine prevlečemo s kolagenom ali drugimi proteini ECM (fibronektin ipd.). Vse omenjene značilnosti, ki so potrebne za uspešno pritrnitev in nadaljno rast celic v adherentnih enoslojnih plasteh veljajo tudi za MN. Površine MN so še dodatno optimizirane glede na specifično vrsto celic. Celice vretenčarjev imajo na svoji površini neenakomerno razporejene negativno nabite ione. To pomeni, da jih lahko gojimo na površinah, ki so negativno ali pozitivno nabite. Površine, primerne za gojenje teh celice, so lahko bodisi steklene ali plastične (negativno nabite), bodisi s pozitivno nabitimi ioni prevlečene strukture (npr. MN *Cytodex-1*). Celice so sposobne rasti na številnih površinah z različno ionsko porazdelitvijo. Glavni dejavnik, odgovoren za pritrnitev in rast celic na MN, je gostota nabojev na površini kulture in ne polarnost nabojev (Maroudas, 1975; GE Healthcare, 2013). Dva ključna dejavnika v gojilnem mediju, ki omogočata pritrnitev celic na MN, sta dvovalentni kationi in proteini v mediju. Večina transformiranih celičnih tipov izloča le malo količino fibronektina, zato ga je potrebno predhodno dodati v medij. Nekatere celice (diploidni fibroblasti) lahko same izločajo velike količine fibronektina in zato ne potrebujejo dodatnega vira proteinov za njihovo pritrnitev (GE Healthcare, 2013). Pri gojenju celičnih kultur je pomembno, da gojilna površina pride najprej v stik z gojilnim medijem, ki vsebuje ustrezen serum. Nato se celice dodajo v kulturo (GE Healthcare, 2013). Načrtovanje gojenja celičnih kultur na MN je torej za vsako vrsto celic tesno povezano z lastnostmi oprijemljivosti celice na podlago. Uspešno morajo biti izvedeni vsi koraki pritrnitve. Le tako so celice sposobne nadaljevati uspešno rast. Za vsako posamezno vrsto celic je potrebno določiti optimalne parametre gojenja na MN.



Slika 5: Shematski prikaz pritrnitve celične kulture na sferično oblikovane MN, potem ko so izpolnjeni vsi pogoji za uspešno pritrnitev in nadaljno rast celic na MN (prirejeno iz Biotechnology and Bioengineering, 2013).

2.2.2 Prednosti MN

MN predstavljajo podporno ogrodje za rast pritrjenih celičnih kultur v 3D okolju. Mobilnost MN v gojilnem mediju generira homogenost, ki je podobna okolju kot ga imajo tradicionalne sesalske celične kulture (Chen in sod., 2013). Glavne prednosti 3D sistema MN v primerjavi z 2D okoljem celičnih kultur so:

1. Visoko razmerje med površino in prostornino. Razmerje se lahko regulira s spremembo koncentracije MN. Na primer 3 mg/ml MN *Cytodex-1* lahko doseže površino $1.32 \times 10^4 \text{ cm}^2$ v 1 l, kar je enakovredno 176 posodam za tkivne kulture s površino 75 cm^2 (Chen in sod., 2013). Z gojenjem celic na MN se tako prihrani laboratorijski prostor in olajša celoten postopek gojenja celic.
2. Homogeno mešanje suspenzije MN v kulturi omogoča spremljanje in nadzor različnih okoljskih parametrov (npr. pH, pO_2 , koncentracije sestavin gojilnega medija).
3. Makroporozni MN omogočajo rast in širjenje celic znotraj por MN. Celice so tako zaščitene pred strižno napetostjo, katero lahko povzroči mešalo v bioreaktorju (Ng in sod., 1996).
4. Število celic gojenih na MN se poveča tako, da se konfluentne celice lahko same povežejo s sosednjimi MN. Celice na MN rastejo dalje brez uporabe proteolitičnih encimov (Blüml, 2007).
5. Ob doseženi konfluenci se v gojilni medij lahko doda nove MN, pri čemer celic ni potrebno precepljati in ob vsaki konfluenci tripsinizirati. To posledično vodi do manjših tveganj za poškodbe in kontaminacije celic.

6. MN se uporabljajo tudi za gojenje perfuzijskih kultur. Prednost je v lažji kontroli in menjavi gojilnega medija (Blüml, 2007).
7. Uporaba MN je usmerjena predvsem v razmnoževanje celic v 3D kulturi, za študije ko-kultur in pri študijah medceličnih interakcij (Martin in sod., 2011).
8. Biorazgradljivi MN se lahko uporabljajo tudi kot nosilci za *in vivo* transplantacijo celic (Martin in sod., 2011).

2.2.3 Komercialni MN

Danes so na tržišču številni MN za uporabo v raziskovalne ali klinične namene. Komercialni MN so bili zasnovani v skladu s potrebami za produkcijo adherentnih celičnih kultur za proizvodnjo cepiv in drugih biofarmaceutskih produktov. Tržišču dostopne MN lahko razdelimo v šest skupin (Chen in sod., 2013):

Skupina 1: Gladki, ne-porozni MN (npr. MN obdani s polistirenom) ali mikro-porozni MN (npr. *Cytodex-1*) s pozitivno nabitimi ioni na svoji površini. Ta skupina MN je primerna za gojenje pritrjenih celic. Celice rastejo na površini MN v monosloju in so skupaj z MN suspendirane v gojilnem mediju z rahlim mešanjem.

Skupina 2: MN obdani s kolagenom (npr. *Cytodex-3* in FACT 102-L). Primerni so za gojenje občutljivih celic, ki imajo nizko učinkovitost nasaditve.

Skupina 3: MN obdani s proteini ECM (npr. Pro-F 102-L). Pro-F 102-L je obdan z rekombinantnim fibronektinom za gojenje občutljivih celic v gojilnem mediju brez dodanega seruma.

Skupina 4: MN brez ionskih nabojev na svoji površini (npr. MN iz stekla ali polistirenski MN P 102-L, kjer je površina enaka tkivni kulturi). MN iz te skupine imajo podobne lastnosti površine kot površine klasičnih tkivnih kultur v 2D okolju.

Skupina 5: Makroporozni MN (npr. *Cytopore* in *Cultispher*). Makroporozni MN imajo na svoji površini pore z velikostjo 10-70 µm v premeru. Zagotavljajo večjo območje za rast celic in nudijo boljšo mehansko zaščito celic pred strižnimi silami, ki nastanejo zaradi mešanja v mešalnih bioreaktorjih.

Skupina 6: MN, ki so pred uporabo ustrezno umerjeni (npr. *Cytoline*). Namenjeni so za uporabo perfuzijskih kultur.

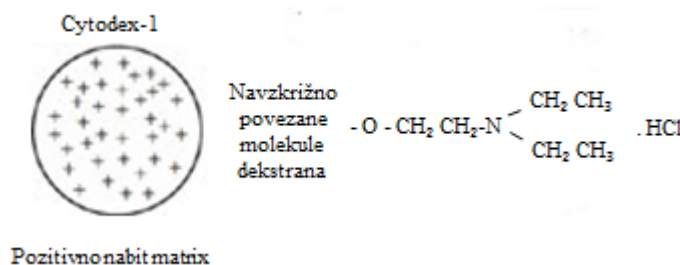
2.2.4 MN Cytodex

Cytodex so razviti posebej za gojenje živalskih celic v prostornini vse od nekaj ml do nekaj tisoč litrov. Uporaba MN *Cytodex* v suspenziji celične kulture tako zagotavlja donose več milijonov celic na ml. MN omogočijo višjo gostoto celic kot tudi višjo produktivnost celičnih kultur. Celične kulture, ki vsebujejo MN so bolj homogene. Matriks *Cytodex* temelji na mrežno sestavljenih dekstranovih kroglicah. Kroglice so mikroporozne, transparentne, hidrirane in so lahko zamenjane s pozitivno nabitimi DEAE skupinami (*Cytodex-1*) ali s kolagenom (*Cytodex-3*). V ustreznih gojilnih posodah (mešalni bioreaktorji, mešalne cisterne, mešalne steklenke) MN ustvarijo homogeno okolje za rast celic. Gojilne posode za MN omogočajo enostavno spremljanje in nadzor osnovnih parametrov gojenja celic na MN. *Cytodex* spada v skupino mikroporoznih MN, kjer imajo celice iz vseh strani dostop do hranil.

Cytodex-1

Površina *Cytodex-1* je prekrita s pozitivno nabitimi N, N-dietilaminoetil (DEAE) skupinami. Pozitivno nabite skupine omogočijo kemično vezavo negativno nabitih celic in predstavljajo optimalne pogoje za pritrditev in rast celic na njihovi površini.

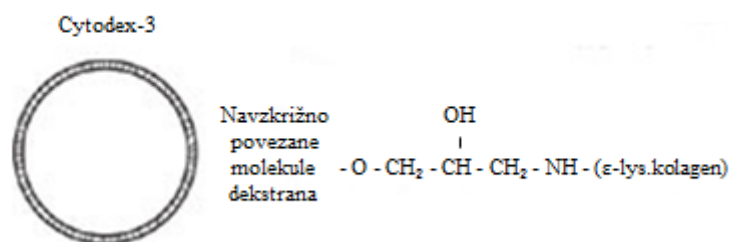
Cytodex-1 so primerni za gojenje in produkcijo številnih celičnih linij, za produkcijo virusov, primarnih celičnih kultur in diploidnih vrst celic.



Slika 6: Shematski prikaz zgradbe MN *Cytodex-1*. Površina MN je prekrita s pozitivno nabitimi DEAE skupinami (GE Healthcare, 2013).

Cytodex-3

Večina MN ima na svoji površini majhne molekule z naboji, ki omogočajo pritrđitev in rast celic. Za razliko ima *Cytodex-3* nekoliko drugačno sestavo. Površino prekriva denaturiran protein kolagen, kovalentno povezan s podpornim ogrodjem, ki je iz mrežnega dekstrana (Gebb in sod., 1984). Kolagen, ki prekriva površino MN, je kolagen tipa I in je pridobljen iz kože svinje. V ta namen se *Cytodex-3* lahko uporablja tudi kot substrat za celične kulture, saj se večina epiteljskih celic bolj učinkovito veže na kolagen kot na druge površine. *Cytodex-3* je primeren za gojenje bolj občutljivih celic, ki težje rastejo v kulturi. S kolagenom prevlečene površine MN dopuščajo *in vitro* diferenciacijo celic tudi pri zelo redkih gostotah (GE Healthcare, 2013). V ta namen se pogosto uporabljajo pri študijah celičnih funkcij in diferenciacije. Pomembna prednost s kolagenom obdanih MN je, da upočasnijo odstop celičnih plasti. To se sčasoma pojavi pri večji gostoti celic, ki jo gojimo dlje časa na površinah, ki niso obdane s kolagenom. *Cytodex-3* so tako primerni za gojenje hepatocitov, fibroblastov, hondrocitov, epidermalnih celic, mioblastov, epitelnih celic (GE Healthcare, 2013). Vse omenjene celične linije se bolj uspešno gojijo na površini obdani s kolagenom, saj ta omogoči maksimalno pritrđitev teh celic na MN kot tudi spodbuja kasnejšo rast (Gebb in sod., 1984).



Slika 7: Shematski prikaz zgradbe MN *Cytodex-3*. Matriks MN je sestavljen iz molekul dekstrana na katerega je kovalentno vezan denaturiran kolagen (GE Healthcare, 2013).

Uporaba kolagena kot podlaga za celično rast se je uporabljala že v preteklosti, vendar je bil glavni problem, da se je kolagen hitro odstranil iz površine. V primeru *Cytodex-3* je težava odpravljena, saj je kolagen zamrežen v dekstranovem ogrodju. S tem se prepreči izguba kolagena. Podporno ogrodje je porozno, kar omogoča dostop nutrientov do celic. Še dodatna prednost *Cytodex-3* je preprosto odstranjevanje celic iz MN, saj številne proteaze, kot so tripsin in kolagenaze, omogočijo razgradnjo kolagena (GE Healthcare, 2013).

2.2.5 Uporaba MN

Tehnologija gojenja celic na MN se danes uspešno uporablja predvsem v industrijske namene, za produkcijo cepiv, vektorjev za gensko terapijo, pri produkciji naravnih in rekombinantnih proteinov in za produkcijo monoklonskih protiteles. Poleg tega omogoča izboljšane donose celičnih linij. Te lahko nadalje uporabimo za celično terapijo, nekoliko zmanjšana pa je še uporaba MN pri transplantacijah in izdelavi umetnih tkiv ali organov (GE Healthcare, 2013).

2.2.5.1 Produkcija večjih donosov celičnih linij za terapevtske namene

Glavno področje uporabe MN je produkcija velikega števila celic iz majhne prostornine celičnih kultur. Sistem MN je zasnovan tako, da omogoča povečanje razmerja med celično površino in prostornino ter hkrati ohranja visoko celično gostoto v kulturi. Z

tradicionalnimi gojilnimi tehnikami enoslojnih celičnih kultur tako visokega razmerja med površino in prostornino ne moremo doseči. S povečanjem razmerja dosežemo večji končni izkupiček celic, še preden je potrebno ponovno precepljanje celic v novo gojišče. Takšen način gojenja predstavlja dodatne prednosti.

a) Uporaba MN za produkcijo cepiv

Uporaba MN kot substrat ali podlaga za produkcijo številnih cepiv se v zadnjih desetletjih uspešno uporablja pri številnih evropskih kot tudi svetovnih proizvajalcih cepiv. Predstavljajo le eno izmed številnih možnosti uporabe MN. Za produkcijo virusov, virusnih vektorjev ali celičnih produktov moramo izbrati ustrezne MN. Eden takšnih je *Cytodex*, ki omogoča rast širokega spektra pritrjenih celičnih linij. Danes se že uspešno uporablja širok nabor cepiv, pri katerih se celice z virusi (polio, rubella, rabies, influenza, Japanese encephalitis, RSV, adenovirus) producirajo na MN. Prednost uporabe MN za produkcijo cepiv je povečana produktivnost, nižji ekonomski stroški, zmanjšana verjetnost okužbe v primerjavi z ostalimi metodami gojenja celičnih kultur.

b) Uporaba MN za produkcijo naravnih in rekombinantnih proteinov

MN se uporabljajo tudi za produkcijo rekombinantnih in naravnih proteinov v terapevtske namene. Za proizvodnjo rekombinantnih proteinov se uporabljajo celice iz ovarija kitajskega hrčka (CHO celice). Celice CHO so prilagojene za gojenje v suspenzijski kulturi in rasti pri nizki gostoti celic. To je predstavljajo precejšnje težave pri gojenju teh celic na prvotnih MN. Z razvojem makroporoznih MN, ki omogočajo večjo celično gostoto, se je povečala tudi stabilnost in produktivnost celic CHO. Glavna prednost makroporoznih MN pri gojenju CHO je zmožnost dolgoročne proizvodnje v procesu perfuzije. Celice CHO se gojijo na MN v perfuzijskih reaktorjih, ki omogočajo boljšo oskrbo z hranili in kisikom (GE Healthcare, 2013).

Naravne proteine lahko pridobimo iz diploidnih celičnih linij, ki jih gojimo na površini MN v mešalnih bioreaktorjih. Z optimizacijo postopkov gojenja in rasti humanih

fibroblastov na MN (Clark in Hirtenstein, 1981) lahko danes gojimo humane fibroblaste za produkcijo večjega donosa interferonov kot v adherentnih enoslojnih plasteh (GE Healthcare, 2013; Clark in Hirtenstein, 1981). Interferoni so glikoproteini in se izločajo iz celic imunskega sistema kot odgovor na vdor virusov, kar prepreči njihovo razmnoževanje. Interferoni na viruse delujejo nespecifično in so del naravnega imunskega sistema. Zaradi njihove protivirusne dejavnosti se uporabljajo pri zdravljenju virusnih bolezni in pri številnih rakavih obolenjih (Malmgaard, 2004; GE Healthcare, 2013). Za produkcijo interferonov iz fibroblastov so se kot najučinkovitejši izkazali MN tipa *Cytodex* (GE Healthcare, 2013).

c) Uporaba MN za produkcijo monoklonskih protiteles

Zdravljenje s pomočjo monoklonskih protiteles je v zadnjih desetletjih strmo naraslo, kar vodi do večje potrebe po proizvodnji protiteles. Za uspešno zdravljenje mora biti odmerek protiteles sorazmerno velik. To nas pripelje do vprašanja, kako zagotoviti velike količine protiteles. Pri proizvodnji monoklonskih protiteles so kot najučinkovitejši v uporabi makroporozni MN. S povečanjem gostote celic v bioreaktorju lahko dodatno povečamo proizvodnjo celic. Gostoto celic v reaktorju najlažje povečamo z dodajanjem MN v celično suspenzijo. S tem so celice sposobne povečati svojo gostoto tudi do 10-krat (GE Healthcare, 2013). Zaradi velikih donosov celic pa je potrebno v reaktorju zagotoviti perfuzijo, ki omogoči podporo celicam pri oskrbi z hranili. Perfuzijska tehnologija z uporabo makroporoznih MN omogoča stopnjevanje samega procesa v produkciji celic kot tudi poveča kakovost izdelka.

2.2.5.2 Študije celičnih funkcij, metabolizma in diferenciacije

Sposobnost gojenja celičnih kultur pri visokih gostotah v homogenem sistemu omogoča priložnost za študije celičnih funkcij, metabolizma in diferenciacije. MN omogočajo izboljšane pogoje gojenja celic kot v adherentnih enoslojnih plasteh. Zaradi 3D okolja in sferične oblike MN je lažje spremljanje celičnih procesov. Na primer MN *Cytodex* so se izkazali za uspešne pri gojenju endokrinih celic (Bone in Hellerström, 1980; Bone in Swenne, 1982). Ker so MN sposobni vzdrževati visoke gostote celic v daljšem

časovnem obdobju, je tako omogočeno sproščanje hormonov v daljšem časovnem obsegu. Celice trebušne slinavke, gojene na MN, so zmožne sinteze in sproščanje inzulina v obdobju enega tedna rasti na MN (Bone in Swenne, 1982). V ta namen se lahko MN uporabljajo tudi za produkcijo in študije funkcij diferenciranih celic. Progenitorske celice (unipotentne - sposobne diferenciacije le v en celični tip) kot tudi pluripotentne celice so zaradi diferenciacijskega značaja ključne za celično terapijo. MN predstavljajo idealno rešitev, kjer se lahko združi tako rast in diferenciacija teh celic v samem bioreaktorju. S tem se omogoči produkcija velikih količin diferenciranih celic, ki so potrebne za klinično uporabo. Pri tem največji izziv predstavlja postopek diferenciacije celic na MN, saj večina diferenciacijskih protokolov zahteva številne fizične postopke. Ti vključujejo bodisi precepljanje celic ali izbor celic. Kljub temu so mnogi do sedaj že uspeli vzpostaviti ustrezen sistem MN. Potrdili so zmožnost embrionalnih matičnih celic, ki so bile gojene na MN, da tvorijo endodermalni celični tip, vključno s pankreatičnimi otočki in jetrnimi celicami v terapevtsko uporabnih količinah (Lock in Tzanakakis, 2009). Z ustreznimi MN se lahko celice diferencirajo tudi v kardiomiocite. To predstavlja velik napredek za potencialno uporabno pri zdravljenju srčnih poškodb (Lecina in sod., 2010).

2.2.5.3 Uporaba MN kot nosilcev pri transplantacijah

Pri direktni infuziji celic v telo je v nekaterih primerih potrebno celice zaščititi pred imunskim sistemom, zato se takšne celice obda s kapsulo. Makroporozni MN predstavljajo idealno rešitev, saj se lahko skupaj s konfluentnimi celicami obdajo s kapsulo in vstavijo direktno v telo (Sun in sod., 2011). Epitelne celice gojene na razgradljivih MN se lahko uporabljajo pri zdravljenju ran ali opeklin. Ko celice na MN postanejo konfluentne, se lahko skupaj z MN presadijo v bolnika z opeklinami (ali drugimi hujšimi poškodbami kože). Epitelne celice kože omogočijo hitrejše celjenje (Bayram in sod., 2005). Kljub nekaterim že uspešnim poskusom uporabe MN pri transplatacijah, je tovrstna uporaba še nekoliko omejena. Človekov imunski sistem je unikatni in dodatne raziskave na tem področju so potrebne za večjo varnost uporabe MN tudi pri transplatacijah.

2.2.5.4 Izdelava umetnih tkiv

MN se uporabljajo tudi pri izdelavi 3D umetnih tkiv. MN (*Cytodex*, *Cytopore*) se nasadi v kapilare votlih vlaken, ki predstavljajo ustrezno okolje in omogočijo rast celic (npr. umetna jetra) (GE Healthcare, 2013). Prednost uporabe MN v namene tkivnega inženirstva je, da omogočijo veliko razmerje med površino in prostornino, boljšo oskrbo s hranili ter s tem velike donose celic. So enostavni za uporabo. Celice se lahko pritrdijo na MN in izločajo specifične proteine ECM ter oblikujejo ustrezen »celica-MN« konstrukt. Takšne 3D konstrukte se z velikim številom specifično induciranih celic vstavi v poškodovana tkiva (Perez in sod., 2014). Seveda so potrebne dodatne študije *in vivo* implantacije 3D konstruktov in izboljšave na področju diferenciacijskega potenciala teh celic.

2.2.5.5 Subkultivacija celic brez uporabe proteoličnih encimov

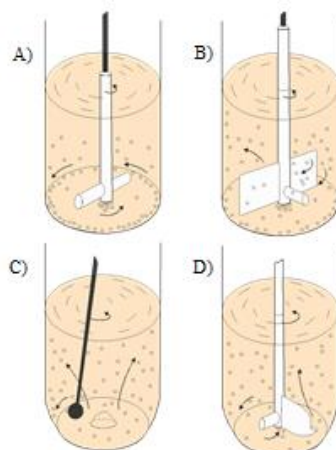
Uporaba celic v terapevtske namene zahteva celice, ki so najboljše možne kakovosti. Z gojenjem celic v adherentnih enoslojnih plasteh se lahko kvaliteta celic zmanjša s pogostim presajanjem celic in uporabe proteoličnih encimov. MN nudijo ustrezno površino za rast celic. Celice se lahko skupaj z MN prenese v drugo gojilno posodo ali se direktno uporabijo za poskuse, brez odstranitve iz MN. Ko celice dosežejo konfluentnost, lahko migrirajo na nove MN, katere lahko dodamo v celično suspenzijo med gojenjem (Horst in sod., 1980; Ryan in sod., 1980). Z redčenjem konfluentnih MN in dodajanjem novih MN dosežemo podaljšano eksponentno fazo rasti, pri tem pa ne spremenimo funkcionalnosti celic (Crespi and Thilly, 1981).

2.2.5.6 Mikroskopija

MN se lahko uporabijo tudi kot podlaga celičnih kultur za različne mikroskopske tehnike, kot so vrstična elektronska mikroskopija, transmisijska elektronska mikroskopija, različne vrste svetlobne mikroskopije. Prednost uporabe MN v mikroskopiji je enostavna uporaba, prav tako celic ni potrebno odstranjevati iz MN (GE Healthcare, 2013).

2.3 BIOREAKTORSKI SISTEMI ZA GOJENJE CELIC

Da bi zagotovili najboljše rezultate gojenja celic na MN, je potrebno poleg pravilne izbire MN izbrati tudi ustrezno opremo za gojenje celic. MN omogočajo najboljše rezultate pri uporabi opreme, ki omogoča suspenzijo MN z rahlim mešanjem in ustrezno izmenjavo plinov z gojilnim medijem. Mešanje mora biti kontinuirano z enako hitrostjo skozi celotno gojenje celic. V nasprotnem primeru se celice lahko odlepijo iz MN. Oblika posode in mehanizem mešanja MN v suspenziji morata biti ustrezno izbrana, da se prepreči sedimentacija MN v gojilni posodi. Izbira gojilnih posod za gojenje celic na MN je odvisna od namena študije in zelene prostornine celične kulture. Za produkcijo manjših donosov celic se običajno uporabljajo mešalne steklenke s prostornino do petih litrov. Takšne mešalne steklenke vsebujejo različne magnetne mešalne palčke, ki omogočajo kontinuirano mešanje MN v suspenziji. Med gojenjem celic na MN se mešalne steklenke položi na večjo magnetno mešalno ploščo v inkubatorju. Tako se regulira oziroma vzdržuje konstantna hitrost mešanja celic na MN v suspenziji (GE Healthcare, 2013).



Slika 8: Mešalne steklenke z različno oblikovanimi magnetnimi mešalnimi palčkami.

A) Tradicionalne mešalne steklenke proizvajalca Bellco Glass Inc. ali Wheaton Scientific. B) Mešalne steklenke z rotorjem v obliki vesla. C) Mešalna steklenka z okroglo na koncu mešalne palčke (proizvajalec Techne). D) Mešalna steklenka z rotorjem in magnetno palčko iz teflona. Rotor ima obliko pluga, kar omogoča krožno vrtenje MN v suspenziji (GE Healthcare, 2013; Gebb in sod., 1984).

Poleg mešalnih steklenk so v uporabi tudi vrtljive steklenke v obliki valja, fermentorji do prostornine desetih litrov in sistemi za gojenje celičnih kultur, ki temeljijo na pretoku zraka ali tekočine (angl. Air-lift and Fluid-lift culture systems). Pri »Air-lift« in »Fluid-lift« sistemu ni konstantnega kroženja MN v suspenziji, ampak kroženje uravnavajo plinski mehurčki. To lahko privede do večjih strižnih sil, ki poškodujejo celice na MN. Takšen sistem se uporablja le za vrste celice, ki se relativno močno pritrdijo na površino MN. Omogoča večje donose celic kot gojenje celic na MN v mešalnih steklenkah, vendar se težje zagotovijo aseptični pogoji za celične kulture (GE Healthcare, 2013).

Za produkcijo velikega števila celic se lahko uporabijo bioreaktorji s prostornino vse od petih litrov pa do nekaj tisoč litrov. V tem primeru morajo biti bioreaktorji posebej prilagojeni za produkcijo tako velikega števila celic na MN. Omogočiti morajo spremljanje in nadzor parametrov gojenja, kot so plini in pH. Bioreaktorski sistemi, ki so večinoma v uporabi, so mešalne cisterne ali gojilni rezervoarji napolnjeni z MN (angl. »Packed beds«). Pri slednjem so MN lahko zapakirani v »kletki«, ki se vstavi v notranjost mešalne cisterne. Gojilni medij kroži v »kletki« z uporabo rotorja. Druga možnost je, da se MN (*Cytopore*, *Cytoline*) zapakira v kolono, pri čemer se mora medij črpati skozi kolono. Glavne prednosti so nizka moč strižnih sil, visoka gostota in produkcija celic ter ni abrazije MN. Slabosti tega sistema so slaba preskrba s kisikom in težje pridobivanje končne biomase iz paketa MN. Poleg omenjenih, se lahko uporabljajo tudi gojilni reaktorji za utekočinjenje biomase (angl. »Fluidized bed«) (GE Healthcare, 2013). Gojilni reaktorji, ki omogočajo utekočinjenje trdnih snovi, temeljijo na zunanjem ali notranjem kroženju snovi. Takšen sistem omogoča kontroliran, stalen prenos utekočinjenih plinov do celic.

2.4 OPTIMALNI POGOJI GOJENJA MMC NA MN

MMC lahko gojimo v adherentni enoslojni plasti, ki predstavlja 2D okolje, vedno pogosteje pa se uporablja alternativna metoda gojenja na MN, ki v suspenziji predstavljajo 3D okolje. Ker se gojenje celic v 3D okolju razlikuje od gojenja v 2D okolju, je potrebno zagotoviti ustrezne pogoje gojenja za produkcijo največjega možnega števila celic. V naši nalogi smo ASC gojili *in vitro* na MN in pri tem optimizirali različne parametre gojenja celic.

Optimalni pogoji gojenja MMC na MN so ključni za namnožitev zadostnega števila celic v terapevtske namene. Katere MN bomo izbrali, je odvisno od vrste in končne uporabe celic. Za gojenje MMC so se izkazali najbolj primerni MN tipa *Cytodex* (1 in 3) ter *Cultispher* (Scoop in sod., 2010; Chen in sod., 2013; Goh in sod., 2013). Pomemben vidik pri izbiri MN je končna uporaba proizvoda. Kadar potrebujemo suspenzijo posameznih celic bodisi za nasaditev teh celic na razna ogrodja ali za transplantacijo, se lahko uporabijo nerazgradljivi MN, saj bomo celice pred uporabo odstranili iz MN. Primeri takšnih MN so *Cytodex*, ki imajo površino obdano z dekstranom ali polistirenski MN. V primerih direktne transplantacije, ko celice skupaj z MN nasadimo na ogrodja ali v telo, moramo uporabiti biorazgradljive MN (npr. *Cultispher*, ki temelji na osnovi želatine).

Glede na vrsto celic in vrsto MN se izbereje še ustrezne mešalne steklenke. Najpogosteje se uporabljajo 100-250 ml mešalne steklenke brez regulacije vsebnosti kisika in pH (Chen in sod., 2013). Za mnoge terapevtske ali klinične namene, kjer je potreba po MMC ogromna, manjše mešalne steklenke v prostornini 100-250 ml ne zadostujejo. V ta namen so se začeli razvijati večji mešalni bioreaktorji s prostornino 1 l (Goh in sod., 2013) do 5 l (Rafiq in sod., 2013), ki omogočajo večjo produkcijo celic.

Optimalna gostota nasaditve MMC obsega 3-5 celic na posamezen MN, pri čemer je zabeležena 7-20 kratna povečana stopnja rasti MMC (Chen in sod., 2013). Pod optimalnimi pogoji MMC povsem prerastejo MN in dosežejo površinsko gostoto 2-4 x

10^4 celic/cm² (Chen in sod., 2013). Dosežena gostota celic varira glede na vrsto celic in je odvisna od pogojev gojenja. Na večji donos celic vpliva ustežen gojilni medij. ASC gojimo v mediju DMEM z dodanim 10-20 % serumom govejega zarodka (FBS) (Chen in sod., 2013). Za optimalen donos celic je pomemben tudi pravilen režim menjave medija, ki obsega menjavo vsaka 2-3 dni (Chen in sod., 2013; Schop in sod., 2008). Pogostost menjave medija lahko vpliva na proliferacijo celic. Zelo pogost režim menjave medija pa je neprimeren predvsem iz finančnega vidika, kadar želimo pridobiti velike količine celic. V ta namen se za produkcijo velikega števila MMC uporablja gojilni medij, ki vsebuje humani serum albumin, tranferin, inzulin in lipide. Takšen medij omogoča optimalen prehranjevalni režim za daljše časovno obdobje (Sart in sod., 2010; Schop in sod., 2010). Potrebne so še dodatne študije metabolizma MMC, ki bodo omogočile razvoj dolgotrajnejšega načina hranjenja z ustreznimi hranili in rastnimi faktorji (Chen in sod., 2013). Za kakovosten končni produkt je poleg uspešne pritrditve in nadaljne rasti celic na MN, pomembna tudi uspešna odstranitev celic iz MN po zaključeni rasti (Rafiq in sod., 2013). MMC se najučinkoviteje odstrani iz MN z uporabo tripsina, ki nima signifikantnega vpliva na sposobnost preživetja celic. Celice bi naj po odstranitvi iz MN ohranile svoj imuno-fenotip, sposobnost diferenciacije in proliferacijski potencial enako kot celice iz adherentnih enoslojnih plasti (Goh in sod., 2013; Rafiq in sod., 2013). Gojenje celic na MN naj bi nudilo celicam enake oziroma izboljšane pogoje, tako za samo pritrditev na rastno površino kot tudi nadaljno rast, sposobnost diferenciacije in naj ne bi vplivalo na kakovost ali kvantiteto MMC. Slednje parametre gojenja celic na MN smo optimizirali tudi v naši nalogi.

3 MATERIALI IN METODE

Za eksperimentalni del magistrske naloge smo uporabili dva vzorca mezenhimskih matičnih celic iz maščevja (ASC). Vzorca maščobe smo dobili iz zdravstvenega centra Simed (Plastična, rekonstrukcijska in estetska kirurgija, Ljubljana, Slovenija) po opravljenem liposukcijskem posegu. Pacienta sta pisno privolila v darovanje tkiva za raziskovalne namene, prav tako je bilo pridobljeno soglasje s strani etične komisije, številka dokumenta je 134/01/11. Vzorca tkiva sta bila odvzeta iz abdominalnega dela pacientov, iz katerega smo izolirali stromalno vaskularno frakcijo (SVF). Z nadaljnjimi gojilnimi postopki smo pridobili celično linijo K16. Slednjo smo namnožili do pasaže 4 in zamrznili v tekočem dušiku do uporabe. Izolacija ASC je opisana v podpoglavju 2.1.1.3 Izolacija ASC po objavljenem protokolu (Gimble in sod., 2007).

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 3: Seznam uporabljenih kemikalij.

Okrajšava	Polno ime	Proizvajalec	Kataloška številka
DMEM-gojišče	Dulbeccovo modificirano gojišče (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	Sigma-Aldrich, ZDA	D5921
L-glutamin	L-glutamin, 200 mM	PAA Laboratories, Avstrija	M11-006
P/S	Penicilin/Streptomycin 100 x	PAA Laboratories, Avstrija	P11-010
FBS	Serum govejega zarodka (<i>Fetale Bovine Serum</i>)	Sigma-Aldrich, ZDA	F7524
Trypsin	Trypsin-EDTA, 0.25 %, 1 x	Gibco Invitrogen	25200-056
PBS 10 x	Slana fosfatna puferska raztopina (<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>)	PAA Laboratories, Avstrija	H15-011
Tripansko modrilo	Tripansko modrilo 0,4 % (<i>Trypan Blue Solution</i>)	Sigma-Aldrich, Nemčija	T8154
Trypsin	Trypsin 250 (<i>Trypsin250</i>)	Difco BD, ZDA	215240
EDTA	Etilendiaminotetraacetna kislina (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)	Sigma-Aldrich, ZDA	E5134-250G
NaCl	Natrijev klorid	Emsure, Merck KgaA, Nemčija	K43390104218
KCl	Kalijev klorid	Fluka, Švica	60130
Glukoza	D-Glukoza (<i>D-(+)- Glucose</i> , 99.5 %)	Sigma-Aldrich, ZDA	G7528

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 3. Seznam uporabljenih kemikalij.

NaHCO ₃	Natrijev hidrogen karbonat	Riedel-de Haen, ZDA	13433
Deksametazon	Deksametazon	Sigma-Aldrich, ZDA	D2915
IBMX	3-Izobutil-1-metilksantin (3-Isobutyl-1-methylxanthine)	Sigma-Aldrich, ZDA	170018
Inzulin	Inzulin	Sigma-Aldrich, ZDA	10259
Indometacin	Indometacin	Sigma-Aldrich, ZDA	17378
Glicerofosfat	Glicerofosfat	Sigma-Aldrich, ZDA	
Askorbinska kislina	L-Askorbinska kislina	Sigma-Aldrich, ZDA	A0278-100G
TGFβ3	Tranformirajoči rastni faktor beta 3 (Transforming growth factorbeta 3)	Sigma-Aldrich, ZDA	SRP3171
DMSO	Dimetil sulfoksid (Dimethyl Sulfoxide)	Sigma-Aldrich, ZDA	D2438
Na ₂ CO ₃	Natrijev karbonat	Sigma-Aldrich, ZDA	
Paraformaldehid	Paraformaldehid	Sigma-Aldrich, ZDA	158127
2-propanol	Izopropanol	Sigma-Aldrich, ZDA	190764
Oil Red O	Oil Red O	Sigma-Aldrich, ZDA	625
Mayerjeva raztopina hematoksilina	Mayerjeva raztopina (Mayer's Hematoxylin solution)	Fluka, Švica	51275
AgNO ₃	Srebrov nitrat 5 %	Sigma-Aldrich, ZDA	S-8157
Pirogalol (C ₆ H ₆ O ₃)	Pirogalol	Sigma-Aldrich, ZDA	16040
Na ₂ S ₂ O ₃	Natrijev tiosulfat	Sigma-Aldrich, ZDA	S-1648
Alcian blue	Alcian blue	Sigma-Aldrich, ZDA	A-3157
EtOH	70 % alkohol-etanol	NIB	
Mikronosilci Cytodex-1	Cytodex™ 1	GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Švedska	17-0448-01
Mikronosilci Cytodex-3	Cytodex™ 3	GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Švedska	17-0485-01

3.1.2 Laboratorijska oprema

Preglednica 4: Seznam uporabljene laboratorijske opreme

Materiali	Proizvajalec
Centrifugirke (15 ml in 50 ml)	Corning Incorporated, ZDA
Epruvete (0.6 ml, 1.5 ml, 2 ml)	Costar, ZDA
Epruvete za zamrzovanje celic (2 ml)	Costar, ZDA
Nastavki za pipete s filtrom	Corning Incorporated, ZDA
Pipete (2, 10, 20, 200, 1000 µl)	Biohit, Finska
Pipetor	Integra Biosciences
Hemocitometer (Bürker-Türk), 0.0025 mm ²	Blau Brand, Nemčija
Objektna stekla	Brand, Nemčija
Krovna stekla	Brand Lab, Nemčija

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 4. Seznam uporabljene laboratorijske opreme.

Plastenke za celične kulture s perforiranim zamaškom (25 cm ² in 75 cm ²)	Corning Incorporated, ZDA
Stacionarne posode s 6 in 24 vdolbinami	Corning Incorporated, Costar, ZDA
Cedilo za celice	BD Falcon, ZDA
Sterilne pipete – stripete 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning Incorporated, Costar, ZDA
Filter za brizge (<i>Syringe filter</i>)	Corning Incorporated, Nemčija
Plastična sterilna brizga, 10 ml	Becton Dickinson, Španija
Borosilikatne mešalne steklenke Techne TM , F7987, 125 ml	Fisher Scientific, Anglija
Brezprašna celična komora	Iskra Pio, Slovenija
Centrifuga PLC-322	Tehtnica Železniki, Slovenija
Inkubator	Sanyo Electric, Japonska
Svetlobni mikroskop	Nikon, Japonska
Stresalnik	IKA, Nemčija
Vodna kopel (37 °C)	Precision Scientific Inc
Fotoaparat	Nikon, Japonska
Hladilnik (+4 °C)	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-20 °C)	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-80 °C)	Angelantoni scientifica, Italija
Digestorij	Koetterman, Nemčija
Mikrocentrifugirka	Eppendorf, Nemčija
Mešalna plošča MNS-104S	Techne, Golias

3.2 POTEK DELA

V magistrski nalogi smo testirali in optimizirali različne parametre, ki so ključni pri gojenju ASC na MN v gojilni suspenziji za namnožitev čim večjega števila celic. Poskus smo zasnovali tako, da smo celice najprej namnožili v adherentni enoslojni plasti do pasaže 6 in jih nato nasadili na MN v mešalne steklenke. Sledila je optimizacija gojenja ASC na MN.

1. Gojenje celične kulture ASC (celična linija K16) v adherentni enoslojni plasti (T25 in T75) do pasaže 6.
2. Nasaditev ASC K16 pri pasaži 7 na MN v mešalne steklenke. Pri tem smo optimizirali naslednje parametre gojenja celic na MN v gojilni suspenziji:

- a.) Analiza vpliva predinkubacije MN na rast in končno število celic.
- b.) Analiza vpliva pogostosti menjave medija na končno število celic.
- c.) Testiranje proliferacijskega potenciala celic po gojenju na MN.
- d.) Testiranje diferenciacijskega potenciala celic po gojenju na MN.

3.3 METODE

3.3.1 Priprava gojišča za ASC

ASC smo gojili v gojilnem mediju DMEM z dodanim 20 % FBS (GM).

Preglednica 5: Sestava medija za gojenje ASC za končno prostornino 50 ml.

GM	
DMEM-Lg	39 ml
FBS (20 %)	10 ml
Penicilin/Streptomicin	500 μ l
L-glutamin (2 mM)	500 μ l

3.3.2 Gojenje ASC v adherentni enoslojni plasti

ASC so bile zamrznjene v tekočem dušiku. Pred uporabo smo epruveto z zamrznjenimi ASC odtajali v vodni kopeli in dodali 5 ml GM. Epruveto s celicami smo centrifugirali 5 minut pri 1000 G/min. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in celice resuspendirali v 1-2 ml GM ter jih prešteli na hemocitometru (metoda štetja celic s hemocitometrom je opisana v podpoglavju 3.3.7). Ustrezno število celic smo nasadili v adherentno enoslojno plast s površino 25 cm² (5 ml GM/150 000 celic/T25) ali 75 cm² (12 ml GM/450 000 celic/T75). Z gojenjem celic smo pričeli pri pasaži 4 z gostoto nasajanja 6000 celic/cm². Celice smo gojili do pasaže 6 in jih dalje uporabili za gojenje na MN.

3.3.3 Precepljanje celic

ASC rastejo v adherentni enoslojni plasti, ki predstavlja 2D okolje, pritrjene na podlago. Celice smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom. Ob doseženi 75 % konfluenci smo jih precepili v novo gojišče.

Postopek precepljanja je bil sledeč:

1. Celicam smo odstranili staro gojišče in jih sprali s 5 ml 1 x PBS.
2. Celice smo inkubirali v 1 ml (T25) oziroma 1.5 ml (T75) tripsina (0.25 %) 5 minut pri 37 °C.
3. Po 5 minutah inkubacije smo dodali 5 (10) ml GM, s katerim smo inaktivirali tripsin.
4. Vsebino posode smo prenesli v 15 ml epruveto.
5. Sledilo je centrifugiranje pri 1000 G/min 5 min.
6. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in celični pelet resuspendirali v ustreznem volumnu GM.
7. Celice smo prešteli na hemocitometru. Pripravili smo si 5 x redčitev celic (40 µl barvila tripan modro in 10 µl resuspendirane celične suspenzije).
8. Ustrezno število celic smo nasadili v novo gojišče z ustrežno prostornino GM.

3.3.4 Zamrzovanje celic

Celice smo zamrznili v ustreznem mediju za zamrznitev z dodanim DMSO.

Preglednica 6: Sestava medija za zamrznitev ASC za končno prostornino 10 ml.

Medij za zamrznitev ASC	
Pripravljen GM	7 ml
20 % FBS	2 ml
DMSO	1 ml

Celice, ki smo jih nameravali zamrzniti, smo pripravili po enakem postopku kot celice za presaditev. Ko smo jih prešteli v celični suspenziji, smo le-to ponovno centrifugirali in celični pelet resuspendirali v 1 ml mediju za zamrznitev celic. V epruvete za zamrzovanje celic smo odpipetirali po 1 ml celične suspenzije. Shranili smo jih za teden dni v zamrzovalnik na -80°C in jih nato prenesli v tekoči dušik.

3.3.5 Priprava MN

Za gojenje celic na MN smo uporabili dva različna tipa MN, in sicer *Cytodex-1* in *Cytodex-3*. Priprava MN je bila pri obeh tipih enaka.

Preglednica 7: Ključne karakteristike MN *Cytodex* (povzeto po GE Healthcare, 2013).

	<i>Cytodex-1</i>	<i>Cytodex-3</i>
Gostota (g/ml)	1.03	1.04
Velikost d_{50} (μm)*	180	175
Velikost $d_{5,95}$ (μm)*	131-220	133-215
Povprečno število MN/g suhe teže	6.8×10^6	4.0×10^6
Povprečna površina (cm^2/g suhe teže)	4.400	2.700
Stopnja nabrekanja (ml/g suhe teže)	18	14
Matriks	Navzkrižno povezane molekule dekstrana	Navzkrižno povezane molekule dekstrana
Površina	Izmenjava hidrofilnih DEAE skupin s pozitivnim nabojem	Tanek sloj denaturiranega kolagena

Velikost temelji na premeru 50 % volumna vzorca MN (d_{50}) ali glede na razpon premera med 5 % in 95 % volumna vzorca MN ($d_{5,95}$).

Preglednica 8: Osnovni parametri gojenja celic na *Cytodex-1*.

<u>Cytodex-1: 2 mg/ml</u>		
	Suha masa MN preračunana glede na površino MN v ustreznem volumnu	Število nasajenih celic glede na površino
Volumen 1 ml	2 mg.....8.8 cm ²	3000 celic/cm ²
Volumen nasajanja 30 ml		
Končni volumen 60 ml	120 mg.....528 cm ²	
PRIPRAVA MN		
Cytodex-1: 2 mg/ml...60 ml = 120 mg → + rezerva 10 % → 140 mg		
Pogoji mešanja na mešalni posodi prvih 24 h: 5 min pri hitrosti 40 rpm in 30 minut mirovanja. Po 24 h: + 30 ml GM, kontinuirano mešanje pri 50 rpm. Menjava medija: Vsaka 2 dni se zamenja 50 % GM		

Preglednica 9: Osnovni parametri gojenja celic na *Cytodex-3*.

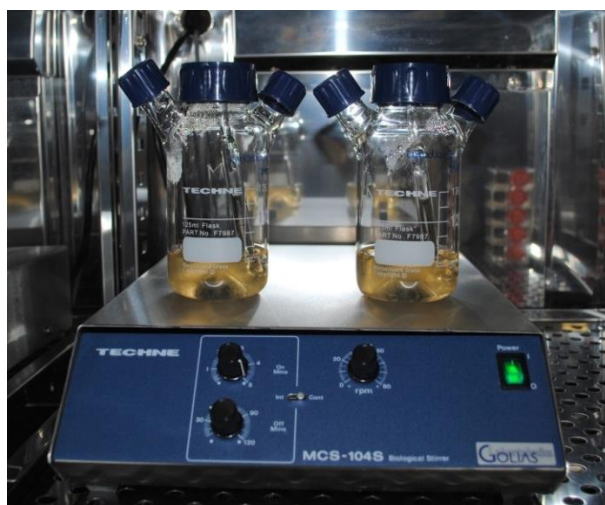
<u>Cytodex-3: 3 mg/ml</u>		
	Suha masa MN preračunana glede na površino MN v ustreznem volumnu	Število nasajenih celic glede na površino
Volumen 1 ml	3 mg.....8.1 cm ²	3000 celic/cm ²
Volumen nasajanja 30 ml		
Končni volumen 60 ml	180 mg.....486 cm ²	
PRIPRAVA MN		
Cytodex-3: 3 mg/ml...60 ml = 180 mg → + rezerva 10 % → 200 mg		
Pogoji mešanja na mešalni posodi prvih 24 h: 5 min pri hitrosti 40 rpm in 30 minut mirovanja. Po 24 h: + 30 ml GM, kontinuirano mešanje pri 50 rpm. Menjava medija: Vsaka 2 dni se zamenja 50 % GM		

Glede na končni volumen smo v 15 ml epruveto zatehtali 140 mg *Cytodex-1* in 200 mg *Cytodex-3*. MN smo hidrirali v 8 ml 1 x PBS (50-100 ml 1 x PBS/g MN) 1.5 h pri sobni temperaturi. Ob dodajanju 1 x PBS smo pazili, da smo s stene epruvete sprali morebitne ostanke MN. Nato smo epruveto še rahlo pretresli, da so se MN popolnoma resuspendirali v 1 x PBS.

Sledila je sterilizacija MN v avtoklavu (121 °C, 20 min). Po avtoklaviranju smo epruvete pospravili v hladilnik na 4 °C do uporabe za poskus. Pripravljene MN smo v hladilniku pustili največ en teden.

3.3.6 Nasajanje in gojenje ASC na MN v gojilni suspenziji

Za poskuse gojenja celic na MN smo uporabili ASC, celično linijo K16, pri pasaži 6. Preden smo celice nasadili na MN, smo pripravljene MN predinkubirali v gojilnem mediju DMEM z 20 % FBS (GM). Odstranili smo 2.5 ml 1 x PBS in ga zamenjali z 2.5 ml GM. Predinkubacija MN je potekala 1.5 h v inkubatorju pri 37 °C. Po končani predinkubaciji smo pripravili mešalne steklenke in celično suspenzijo. Celično suspenzijo smo pripravili enako kakor za precepljanje celic. Pri tem smo za vsako mešalno steklenko uporabili 5 ml celične suspenzije z ustreznim številom celic (6000 celic/cm²). Mešalne steklenke, v katere smo nasadili celice, smo najprej označili na enem mestu, kamor smo dodali pripravljen GM, MN in celice. Označeno mesto je tudi kasneje služilo za menjavo medija. V mešalne steklenke smo vedno najprej dodali MN v volumnu 5 ml. Pazili smo, da MN nismo nanесли na mešalno palčko, ampak smo jih spustili na dno posode. Dodali smo 10 ml GM in 5 ml celične suspenzije. Mešalne steklenke smo prenesli na mešalno ploščo v inkubator s 5 % CO₂ in 37 °C. Prvih 24 h je mešanje potekalo izmenjaje, in sicer 5 min mešanja pri hitrosti 40 rpm, nato je sledilo 30 minut mirovanja brez mešanja. Po 24 h smo celicam dodali še 30 ml GM in na mešalni plošči nastavili kontinuirano mešanje pri hitrosti 50 rpm. GM smo menjavali vsaka 2 dni. Menjava medija je potekala tako, da smo iz gojilne suspenzije odvzeli 30 ml starega GM (50 % končnega volumna) in ga nadomestili s 30 ml svežega. Pri tem smo pazili, da so se MN najprej usedli na dno posode, da jih ob menjavi medija nismo zajeli zraven.



Slika 9: Prikaz gojenja ASC na MN v gojilni suspenziji na mešalni plošči.

3.3.7 Odstranjevanje celic iz MN in štetje celic s hemocitometrom

Število celic na MN v gojilni suspenziji smo določili v volumnu 1 ml. Celice smo prešteli prvi, tretji, šesti, osmi in deseti dan gojenja na MN. Pri tem smo morali celice najprej odstraniti iz MN in jih nato prešteti. Za odstranjevanje celic smo uporabili 0.1 % tripsin 250.

Preglednica 10: Sestava 0.1 % tripsina 250 za končno prostornino 100 ml.

0.1 % tripsin 250	
Tripsin 250 (Difco)	0.1 g
EDTA	0.01 g
Natrijev klorid	0.8 g
Kalijev klorid	0.04 g
Glukoza (anhidrid)	0.09 g
Natrijev hidrogen-karbonat	0.084 g

Tripsin smo si pripravili tako, da smo vse sestavine stehali in dodali destilirano vodo do volumna 100 ml. Raztopino smo prefiltrirali skozi 0.22 μ m filtrirno poro, da smo zagotovili sterilnost. Shranili smo jo v zamrzovalnik na -20°C do uporabe.

Celice smo iz MN odstranili tako, da smo iz gojilne suspenzije s stripeto odvzeli 2 x po 1 ml vzorca. Pred zajemanjem vzorca je bilo pomembno, da smo mešalno steklenko krožno zavrteli, da so se MN dvignili iz dna posode. Vzorec MN s celicami smo s stripeto prenesli v 2 ml mikrocentrifugirke. Ko so se MN v mikrocentrifugirki usedli na dno posode, smo odstranili GM in MN s celicami sprali z 1 x PBS. Nato smo 1 x PBS zamenjali z tripsinom, suspenzijo dobro premešali ter inkubirali pri 37 °C 3 minute. Po treh minutah smo suspenzijo z MN še enkrat premešali na stresalniku za 25-30 sekund pri 1500 G/min, da smo celice lažje odstranili z MN. Ponovno smo inkubirali 3 minute pri 37 °C. Po skupno 6 minutah inkubacije smo dodali GM za inaktivacijo tripsina. Tako smo dobili suspenzijo celic. Predhodno smo si pripravili 40 µl barvila tripan modro, kateremu smo dodali 10 µl celične suspenzije (iz MN). Celice smo prešteli na hemocitometru. Prešteli smo le viabilne celice.

Štetje celic na hemocitometru

Za štetje celic na hemocitometru pod svetlobnim mikroskopom smo uporabili metodo barvanja z barvilom tripan modro, ki specifično obarva mrtve celice. Žive celice se niso obarvale in so bile pravilnih okroglih oblik. Barvilo tripan modro v žive celice ne more vstopati, saj so te zavarovane s celično membrano. V primeru, da celice izgubijo membransko integriteto lahko barvilo prosto vstopa preko membrane in tako obarva znotraj celično vsebino (Strober, 2001). Takšne mrtve celice so se obarvale modro.

Postopek štetja celic na hemocitometru:

- 10 µl celične suspenzije smo prenesli v 40 µl barvila tripan modro.
- Iz volumna 50 µl mešanice celične suspenzije in barvila smo odpipetirali 10 µl, ki smo jih nanegli na hemocitometer.
- Na hemocitometru smo prešteli viabilne celic v vseh štirih kvadrantih.
- Pri izračunu vseh celic v suspenziji smo upoštevali število viabilnih celic v enem kvadrantu ($n/4$), faktor redčenja (R), konstanto prostornine (10^4) in prostornino suspenzije (V) (1).

$$N = (n/4) \times R \times 10^4 \times V \quad \dots (1)$$

3.3.8 Spremljanje rasti celic na MN

3.3.8.1 Vpliv predinkubacije MN na končno število celic v gojilni suspenziji

MN smo pred uporabo inkubirali, pri čemer smo testirali vpliv predinkubacije na rast celic na MN. Pripravili smo si štiri epruvete, kamor smo najprej natehtali MN. V dve smo natehtali 140 mg *Cytodex-1* in v ostali dve 200 mg *Cytodex-3*. MN smo pripravili po postopku, ki je opisan v podpoglavju 3.3.5. *Priprava MN*. Preden smo te uporabili za poskus, smo pripravili dva seta MN. En set MN (*Cytodex-1* in *Cytodex-3*) je bil predinkubiran v GM in en set MN (*Cytodex-1* in *Cytodex-3*) predinkubiran v čistem FBS. Celice smo nasadili na MN, kot je opisano v podpoglavju 3.3.6. *Nasajanje in gojenje ASC na MN v gojilni suspenziji*. Vpliv predinkubacije na rast celic na MN smo preverili tako, da smo prešteli, koliko celic se je pritrdilo in namnožilo na MN med 10-dnevnim poskusom. Celice smo prešteli prvi, tretji, šesti, osmi in deseti dan gojenja na MN. GM smo zamenjali vsaka 2 dni. Rast in morfološke spremembe celic na MN smo spremljali tudi s svetlobnim mikroskopom. Vpliv različne predinkubacije smo ovrednotili s specifično stopnjo rasti celic. Ta ponazarja logaritemsko povečanje eksponentne faze rasti celic glede na končno ($c_x(t)$) in začetno ($c_x(1)$) število pritrjenih celic (2). Iz specifične stopnje rasti celic smo izračunali še podvojitveni čas celic (3). Primerjali smo tudi stopnjo povečanja celične populacije na MN pri različni predinkubaciji glede na največjo končno število celic ($c_x(f)$) in začetno število ($c_x(1)$) pritrjenih celic (4) (povzeto po Rafiq in sod., 2013).

$$\text{Specifična stopnja rasti celic } (\mu): \mu = (\ln(c_x(t)/c_x(1))) / \Delta t \quad \dots (2)$$

$$\text{Čas podvajanja celic } (t_d): t_d = \ln 2 / \mu \quad \dots (3)$$

$$\text{Stopnja povečanja celične populacije} = c_x(f) / c_x(1) \quad \dots (4)$$

3.3.8.2 Vpliv pogostosti menjave GM na končno število celic na MN

Testirali smo vpliv pogostosti menjave GM na rast celic na MN. Poskus smo zastavili tako, da smo ASC nasadili na MN v gojilno suspenzijo in primerjali menjavo GM na vsaka 2 dni z menjavo na vsake 3 dni. Po 24 urah od nasaditve smo prešteli, koliko celic se je pritrdilo na MN in dodali 50 % GM (30 ml). V prvem primeru, kjer smo GM zamenjali vsaka dva dni, smo število celic prešteli še tretji, šesti, osmi in deseti dan gojenja celic na MN. V drugem primeru smo GM zamenjali na vsake tri dni in prešteli število celic na MN še tretji, četrti, sedmi, osmi in deseti dan gojenja. GM smo zamenjali tako, da smo iz gojilne suspenzije odpipetirali 30 ml starega medija in ga nadomestili s 30 ml svežega. Pri tem smo pazili, da so se MN s celicami najprej usedli na dno posode, da jih nismo zajeli zraven. Pogoji mešanja na mešalni plošči so ostali v obeh primerih enaki.

Razliko pri menjavi medija vsaka dva dni z menjavo medija na vsake tri dni smo primerjali na enak način kot vpliv predinkubacije MN. Pri tem smo za vsak primer menjave medija izračunali specifično stopnjo rasti celic, hitrost podvajanja celic in stopnjo povečanja celične populacije na MN.

3.3.8.3 Testiranje proliferacijskega potenciala

Testirali smo proliferacijski potencial celic po gojenju na MN. Poskus je potekel tako, da smo ASC pri pasaži 6 nasadili v adherentno enoslojno plast in sočasno na MN. Po končanem 10-dnevnem gojenju celic na MN smo celice iz MN ponovno nasadili v adherentno enoslojno plast.

Iz gojilne suspenzije smo s stripeto zajeli 1 ml celične suspenzije skupaj z MN in jo prenesli v 2 ml epice. MN s celicami smo sprali z 1 x PBS, dodali tripsin (0.1 % tripsin 250) in inkubirali najprej 3 minute v inkubatorju pri 37 °C. Po treh minutah smo epico pretresli na stresalniku (20-30 sekund, 1500 G/min) in ponovno inkubirali 3 minute. Po inkubaciji smo celični suspenziji dodali GM, s katerim smo inaktivirali tripsin. Suspenzijo s celicami smo precedili skozi najlonsko mrežico v 50 ml epruveto, da smo

odstranili MN. Sledilo je centrifugiranje 5 minut pri 1000 G/min. Nato smo odstranili supernatant in pelet celic resuspendirali v 1-2 ml GM. Celice v celični suspenziji smo prešteli na hemocitometru in jih nasadili v adherentno enoslojno plast s površino 1.9 cm² in gostoto nasajanja 6000 celic/cm². GM smo zamenjali vsaka dva dni ter prešteli število celic prvi, tretji, šesti, osmi in deseti dan gojenja. Rast celic, ki smo jih nasadili po gojenju na MN, smo primerjali z rastjo celic pred gojenjem na MN.

3.3.8.4 Analiza diferenciacijskega potenciala ASC

Testirali in analizirali smo diferenciacijski potencial ASC (linija K16) pred in po gojenju celic na MN. S tem smo želeli preveriti, ali gojenje celic na MN vpliva na njihovo multipotentnost, bodisi da zmanjša ali poveča njihovo sposobnost diferenciacije v adipocite, osteocite in hondrocite. Za testiranje diferenciacijskega potenciala celic pred gojenjem na MN smo uporabili ASC pri pasaži 7. Za testiranje diferenciacijskega potenciala po gojenju na MN smo uporabili ASC, ki so bile gojene na MN (pasaža 7) in smo jih po končanem 10-dnevnom poskusu gojenja ponovno nasadili adherentno enoslojno plast. V obeh primerih smo za poskus diferenciacije celice nasadili v adherentno enoslojno plast s površino 9.5 cm² in gostoto 6000 celic/cm². Vsaka 2-3 dni smo celicam zamenjali GM, vse dokler niso dosegle 90 % konfluence.

a) Diferenciacija celic v adipocite

Ko so celice v adherentni enoslojni plasti dosegle 90 % konfluentno stanje, smo pričeli z dodajanjem indukcijskega medija. Indukcijski medij smo po 48-72 h zamenjali z vzdrževalnim medijem za 24 h in nato zopet celice vzdrževali v indukcijskem mediju 48-72 h. Takšen cikel menjave medijev smo ponovili še dvakrat in nato en teden celice vzdrževali le v vzdrževalnem mediju. Po 21-ih dneh gojenja smo celice pobarvali z *Oil Red O* barvilom za detekcijo znotrajceličnih maščobnih vakuol. S tem smo potrdili uspešnost diferenciacije celic v adipocite. Za negativno kontrolo smo celice gojili le v vzdrževalnem mediju 21 dni. Tekom gojenja in diferenciacije celic smo spremljali morfološke spremembe celic s svetlobnim mikroskopom.

Preglednica 11: Sestava indukcijskega medija za diferenciacijo ASC v adipocite v prostornini 2.5 ml.

Indukcijski medij za adipogeno diferenciacijo (2-3 dni)	
DMEM-Lg	2292.5 μ l
10 % FBS	125 μ l
2 mM Gln	25 μ l
P/S	25 μ l
1 μ M dexametazon	2.5 μ l
0.5 mM IBMX	2.5 μ l
10 μ g/ml inzulin	2.5 μ l
100 μ M indometacin	25 μ l

Preglednica 12: Sestava vzdrževalnega medija za ASC v prostornini 2.5 ml.

Vzdrževalni medij (1 dan)	
DMEM-Lg	2323 μ l
10 % FBS	125 μ l
2 mM Gln	25 μ l
P/S	25 μ l
10 μ g/ml inzulin	2.5 μ l

Za detekcijo znotrajceličnih maščobnih vakuol smo uporabili 0.5 % založno raztopino barvila *Oil Red O* v izopropanolu in barvilo redčeno v destilirani vodi v razmerju 2:3. Celicam smo odstranili GM in jih sprali z 1 x PBS, nato pa jih fiksirali v 4 % paraformaldehidu 10 minut. Po fiksaciji smo jih ponovno sprali z 1 x PBS in dodali 0.18 % raztopino *Oil Red O* barvila za 60 minut. Celice smo še enkrat sprali z destilirano vodo in dodali filtrirano Mayerjevo raztopino hematoksilina za 10 minut. Ponovno je sledilo spiranje z destilirano vodo in fotografiranje diferenciranih celic ter negativne kontrole pod svetlobnim mikroskopom in lupo.

b) Diferenciacija celic v osteocite

Ko so celice v adherentni enoslojni plasti dosegle 70-90 % konfluentno stanje smo pričeli z dodajanjem indukcijskega medija za osteogeno diferenciacijo. Indukcijski medij smo celicam zamenjali 2 x tedensko. Za negativno kontrolo smo celice gojili v navadnem GM. Morfološke spremembe celic smo med gojenjem in diferenciacijo opazovali s svetlobnim mikroskopom.

Preglednica 13: Sestava indukcijskega medij za osteogeno diferenciacijo v prostornini 2.5 ml.

Medij za indukcijo osteogeneze	
DMEM -Lg	2340 μ l
10 % FBS	125 μ l
0.1 μ M dexametazon	0.25 μ l
50 μ g/ml L-askorbinska kislina	10 μ l
10 mM glicerofosfat	25 μ l

Po 10-20-ih dneh gojenja celic v indukcijskem mediju smo uspešnost diferenciacije dokazali z barvanjem po *Von Kossa*, ki specifično obarva kalcijeve depozite.

Celicam smo pred barvanjem odstranili GM in jih sprali z 1 x PBS ter fiksirali v 4 % paraformaldehidu 15 minut. Po fiksaciji smo jih sprali z 1 x PBS in pobarvali s 5 % srebrovim nitratom. Barvanje je potekalo v temi 10 minut. Po spiranju z destilirano vodo smo celice inkubirali še 10 minut v 1 % pirogalolu. Sledilo je ponovno spiranje z destilirano vodo in fiksacija celic s 5 % natrijevim tiosulfatom 5 minut. Po končanem barvanju smo diferencirane celice in negativno kontrolo fotografirali pod svetlobnim mikroskopom in lupo.

c) Diferenciacija celic v hondroците

ASC smo gojili v adherentni enoslojni plasti vse dokler niso dosegle 90 % konfluente, nato pa smo pričeli z dodajanjem indukcijskega medija za hondrogeno diferenciacijo. Indukcijski medij je bil sestavljen iz transformirajočega rastnega dejavnika TGF- β 3 in L-askorbinske kisline. Celice smo v indukcijskem mediju gojili 21 dni, medij pa smo redno menjavali 2 x tedensko. Za negativno kontrolo smo celice gojili v navadnem GM.

Preglednica 14: Sestava indukcijskega medija za hondrogeno diferenciacijo v prostornini 2.5 ml.

Medij za indukcijo hondrogeneze	
DMEM-Lg	2363 μ l
10 % FBS	125 μ l
10 ng/ml TGF β 3	2,5 μ l
50 μ g/ml L-askorbinska kislina	10 μ l

Po 21-ih dneh gojenja smo celice pobarvali z *Alcian blue* za detekcijo mukopolisaharidov in glikozaminoglikanov. S tem smo potrdili uspešnost diferenciacije celic v hondrocite. *Alcian blue* specifično obarva mukopolisaharide in glikozaminoglikane, ki so sestavni deli hrustančnega matriksa.

Celice smo pred barvanjem fiksirali s 4 % paraformaldehidom, tako da smo odstranili GM, jih sprali z 1 x PBS in dodali 4 % paraformaldehid za 10 minut. Po fiksaciji smo celice ponovno sprali z 1 x PBS in dodali raztopino barvila *Alcian blue*, ki je bilo sestavljeno iz 1 % *Alcian blue* in 3 % raztopine očetne kisline, (pH = 2.5). Po 30 minutnem barvanju in spiranju z destilirano vodo smo celice fotografirali pod svetlobnim mikroskopom in lupo.

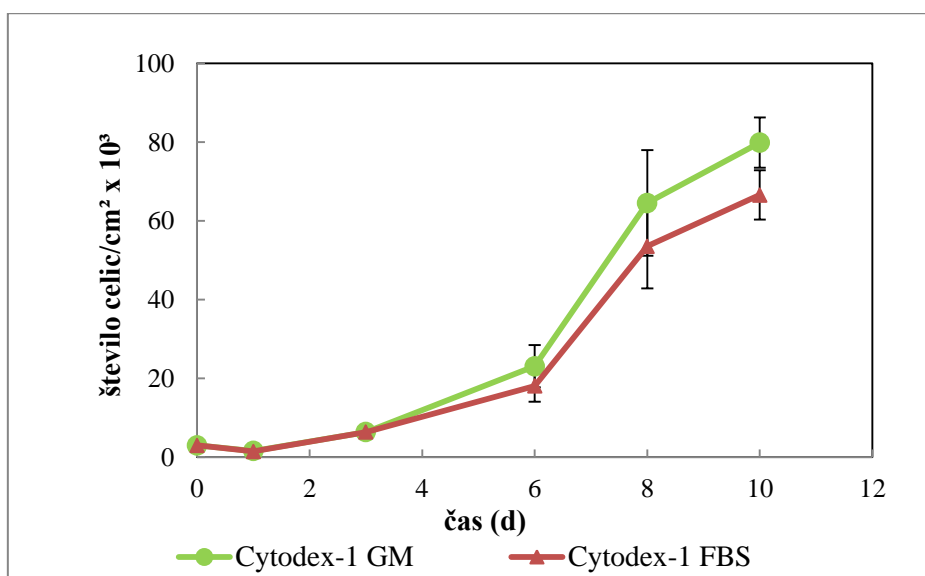
4 REZULTATI

4.1 VPLIV PREDINKUBACIJE MN NA RAST IN KONČNO ŠTEVILO CELIC

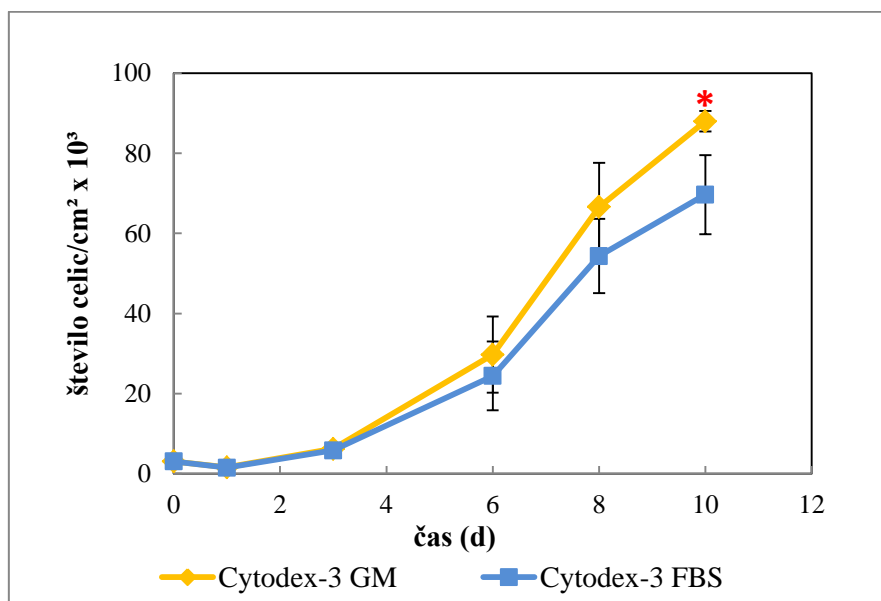
Da bi lahko zagotovili veliko število ASC ustrezne kakovosti, smo optimizirali pogoje gojenja na MN. Testirali smo vpliv predinkubacije MN na rast in končno število celic.

Za testiranje vpliva predinkubacije MN smo uporabili dva tipa MN, *Cytodex-1* in *Cytodex-3*. Pred poskusom smo MN inkubirali v gojilnem mediju DMEM z 20 % FBS (GM) in le v čistem FBS. Pri tem smo želeli potrditi izboljšano rast celic pri predinkubaciji MN v FBS.

Predinkubacija MN v FBS ni pokazala povečanega števila celic na MN. Končno število celic je bilo povečano pri predinkubaciji *Cytodex-1* v GM (Slika 10), vendar število ni bilo signifikantno ($p > 0.05$). Predinkubacija *Cytodex-3* v GM (Slika 11) pa je omogočila signifikantno višje končno število celic od predinkubacije MN v FBS ($*p < 0.05$).

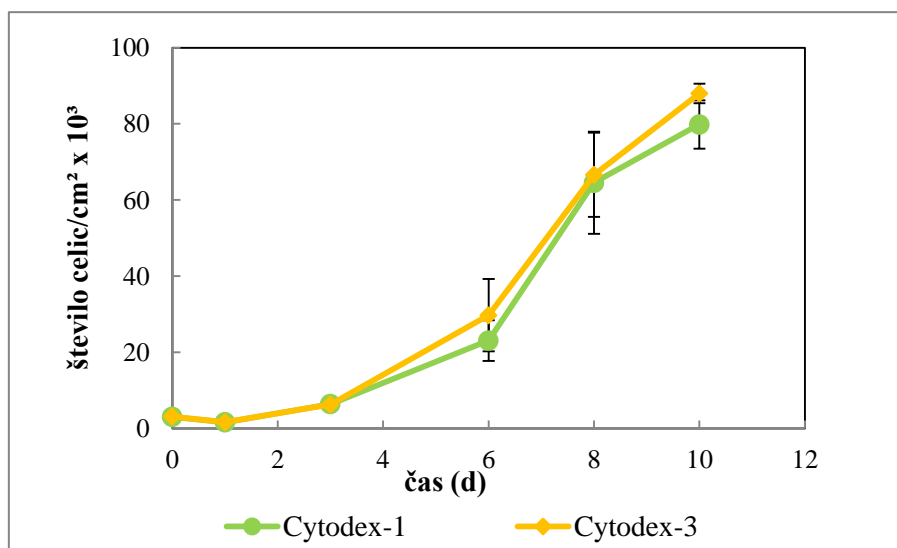


Slika 10: Primerjava vpliva predinkubacije *Cytodex-1* v gojilnem mediju DMEM z 20 % FBS (GM) in čistem FBS ($p > 0.05$). Vsaka točka predstavlja povprečno število celic/cm² treh neodvisnih poskusov \pm standardni odklon.



Slika 11: Primerjava vpliva predinkubacije *Cytodex-3* v gojilnem mediju DMEM z 20 % FBS (GM) in čistem FBS (* $p < 0.05$). Vsaka točka predstavlja povprečno število celic/cm² treh neodvisnih poskusov \pm standardni odklon.

Med različnima tipoma MN, *Cytodex-1* in *Cytodex-3*, ni bilo statistično značilnih razlik v rasti celic (Preglednica 15 a, b, c; $p(c) > 0.05$) in številu celic/cm² ($p > 0.05$) (Slika 12).



Slika 12: Primerjava rasti celic na mikronosilcih (MN) med *Cytodex-1* in *Cytodex-3*. Vsaka točka predstavlja povprečno število celic/cm² treh neodvisnih poskusov \pm standardni odklon.

Rastno kinetiko celic na MN pri različni predinkubaciji smo opredelili s specifično stopnjo rasti celic, s podvojitvenim časom celic in s stopnjo povečanja celične populacije na MN (Preglednica 15 a, b in c). Predinkubacija *Cytodex-1* in *Cytodex-3* v FBS ni pokazala statistično značilne izboljšane rasti celic ($p(a)(b) > 0.05$). Kvečjemu je bila rast celic na *Cytodex-1* boljša pri predinkubaciji MN v GM (tretji dan; $p(a) < 0.05$).

Najvišja specifična stopnja rasti celic je bila prvi in tretji dan gojenja celic na *Cytodex-1* in *Cytodex-3* pri predinkubaciji MN v GM, pri čemer je bila statistično značilno višja stopnja rasti le tretji dan gojenja ASC na *Cytodex-1*.

Preglednica 15 a: Rast ASC na MN *Cytodex-1* in *Cytodex-3* pri različni predinkubaciji MN v GM in FBS. Razlike v rasti celic so podane s specifično stopnjo rasti celic v enoti h^{-1} .

Specifična stopnja rasti celic (h^{-1})							
dnevi	Cy-1 GM	Cy-1 FBS	Cy-3 GM	Cy-3 FBS	<i>p</i> (a)	<i>p</i> (b)	<i>p</i> (c)
1	0.0163	0.0159	0.0167	0.0158	0.213	0.085	0.139
3	0.0105	0.0098	0.0110	0.0103	0.040*	0.212	0.249
6	0.0052	0.0055	0.0047	0.0045	0.707	0.898	0.589
8	0.0009	0.0009	0.0012	0.0010	0.994	0.841	0.701

Cy-*Cytodex*; dnevi 1-8 predstavljajo število pritrjenih celic v primerjavi s končnim številom celic.

p (a) – pričakovane vrednosti za *Cytodex-1* pri različni predinkubaciji, * $p < 0.05$

p (b) – pričakovane vrednosti za *Cytodex-3* pri različni predinkubaciji

p (c) – pričakovane vrednosti za različna tipa MN predinkubiranim v GM

ASC so se najhitreje podvojevale prvi in tretji dan gojenja na *Cytodex-1* in *Cytodex-3* pri predinkubaciji MN v GM, pri čemer je bil podvojitveni čas celic signifikantno višji le tretji dan gojenja ASC na *Cytodex-1*.

Preglednica 15 b: Hitrost podvajanja celic med 10-dnevnim gojenjem na MN. Podvojitveni čas celic je podan v urah (h).

Podvojitveni čas celic (h)							
dnev i	Cy-1 GM	Cy-1 FBS	Cy-3 GM	Cy-3 FBS	<i>p</i> (a)	<i>p</i> (b)	<i>p</i> (c)
1	43	44	42	44	0.209	0.094	0.139
3	66	71	63	68	0.044*	0.213	0.263
6	134	128	157	159	0.698	0.962	0.445
8	1006	1287	770	1022	0.748	0.595	0.597

Cy-Cytodex; dnevi 1-8 predstavljajo število pritrjenih celic v primerjavi s končnim številom celic.

p (a) – pričakovane vrednosti za *Cytodex-1* pri različni predinkubaciji, **p* < 0.05

p (b) – pričakovane vrednosti za *Cytodex-3* pri različni predinkubaciji

p (c) – pričakovane vrednosti za različna tipa MN predinkubiranima v GM

ASC so pri predinkubaciji MN v GM imele višjo stopnjo povečanja celične populacije na MN glede na prvi in tretji dan gojenja celic kot pri predinkubaciji v FBS, vendar so bili rezultati statistično značilni le tretji dan pri *Cytodex-1*.

Preglednica 15c: Stopnja povečanja celične populacije na MN glede na razmerje med končnim in začetnim številom pritrjenih celic.

Stopnja povečanja celične populacije							
dnevi	Cy-1 GM	Cy-1 FBS	Cy-3 GM	Cy-3 FBS	<i>p</i> (a)	<i>p</i> (b)	<i>p</i> (c)
1	50.0	45.1	54.8	45.2	0.221	0.069	0.139
3	12.6	10.6	14.3	11.9	0.037*	0.209	0.234
6	3.6	3.8	3.2	3.1	0.713	0.850	0.689
8	1.3	1.3	1.4	1.3	0.990	0.864	0.698

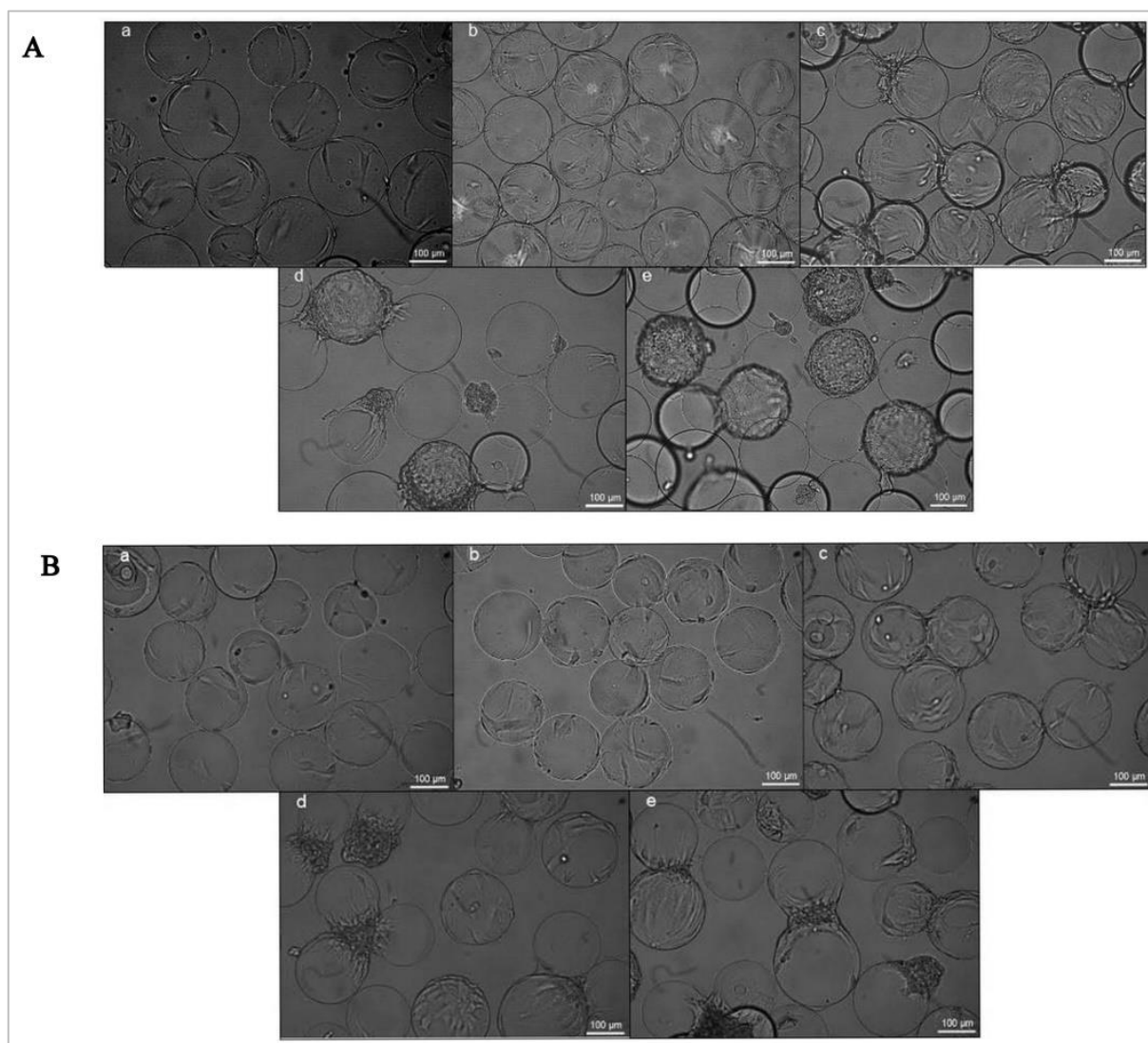
Cy-Cytodex; dnevi 1-8 predstavljajo število pritrjenih celic v primerjavi s končnim številom celic.

p (a) – pričakovane vrednosti za *Cytodex-1* pri različni predinkubaciji, **p* < 0.05

p (b) – pričakovane vrednosti za *Cytodex-3* pri različni predinkubaciji

p (c) – pričakovane vrednosti za različna tipa MN predinkubiranima v GM

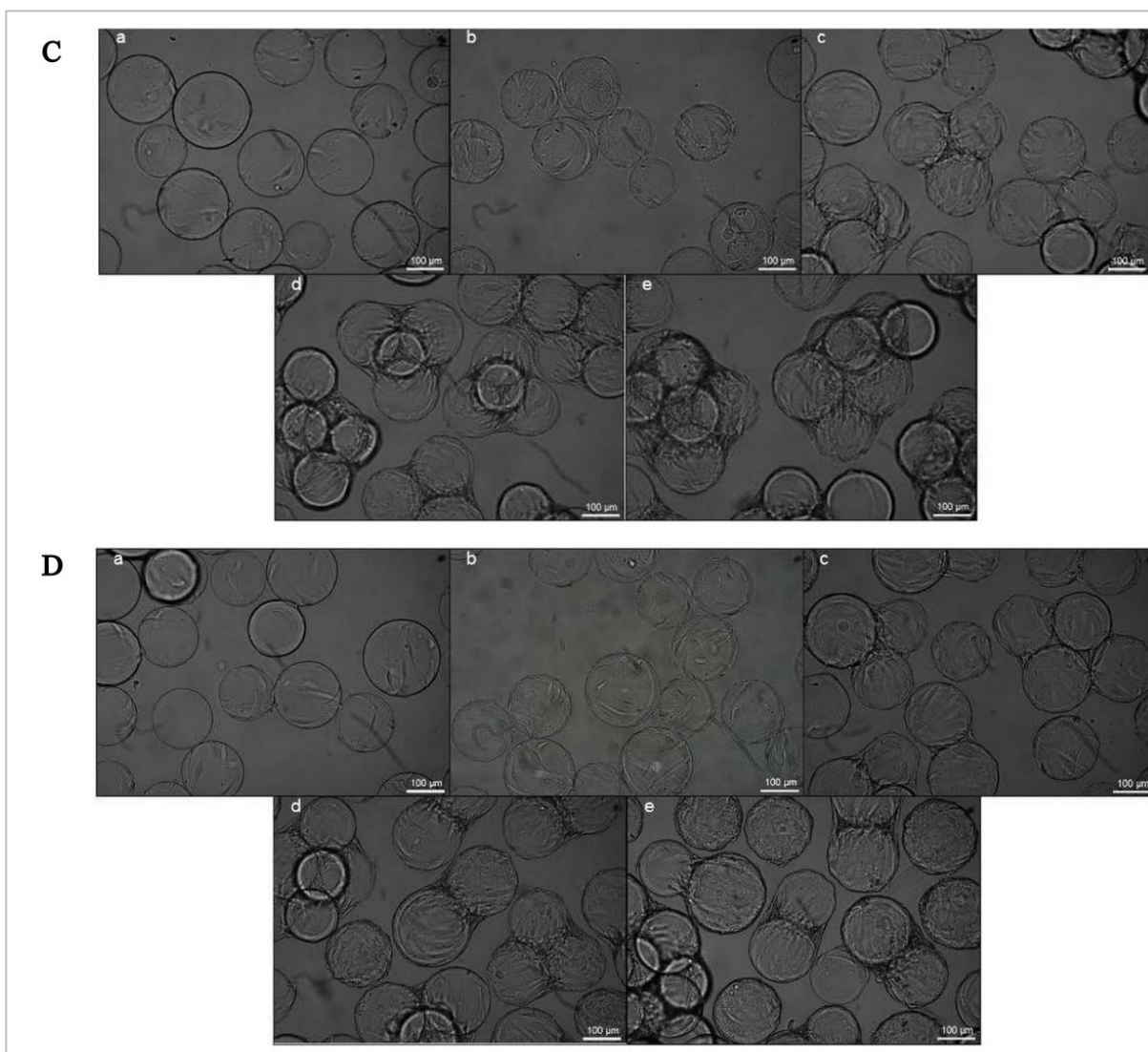
Slika 13 prikazuje rast ASC na *Cytodex-1* pri predinkubaciji MN v GM in FBS. Predinkubacija *Cytodex-1* v GM je pokazala, da so celice na MN dosegle konflueno že šesti dan gojenja. Pri tem se začnejo celice združevati v celične skupke (Slika 13 A_{d-e}). Za razliko je pri predinkubaciji *Cytodex-1* v FBS kasneje prišlo do stanja konfluente. Celični skupki se začnejo oblikovati po šestem dnevu gojenja celic in so prisotni v manjšem številu (Slika 13 B_{d-e}).



Slika 13: A) Rast celične linije ASC K16 (p8) na *Cytodex-1* pri predinkubaciji MN v GM. Slike od (a-e) ponazarjajo prvi, tretji, šesti, osmi in deseti dan gojenja celic na MN v gojilni suspenziji pri 100 x povečavi.

B) Rast celične linije ASC K16 (p8) na *Cytodex-1* pri predinkubaciji MN v FBS. Slike od (a-e) ponazarjajo prvi, tretji, šesti, osmi in deseti dan gojenja celic na MN v gojilni suspenziji pri 100 x povečavi.

Slika 14 prikazuje rast celic na *Cytodex-3* pri predinkubaciji MN v GM in FBS. Celice so dosegle stanje konfluente šesti dan gojenja na MN. Pri tem so se MN začeli zlepljati med seboj (Slika 14 C_{c-e} in D_{c-e}). Pri predinkubaciji v FBS je opaznih manj zlepljenih MN kot pri predinkubaciji v GM, kar kaže na počasnejšo rast celic na MN predinkubiranimi v FBS.

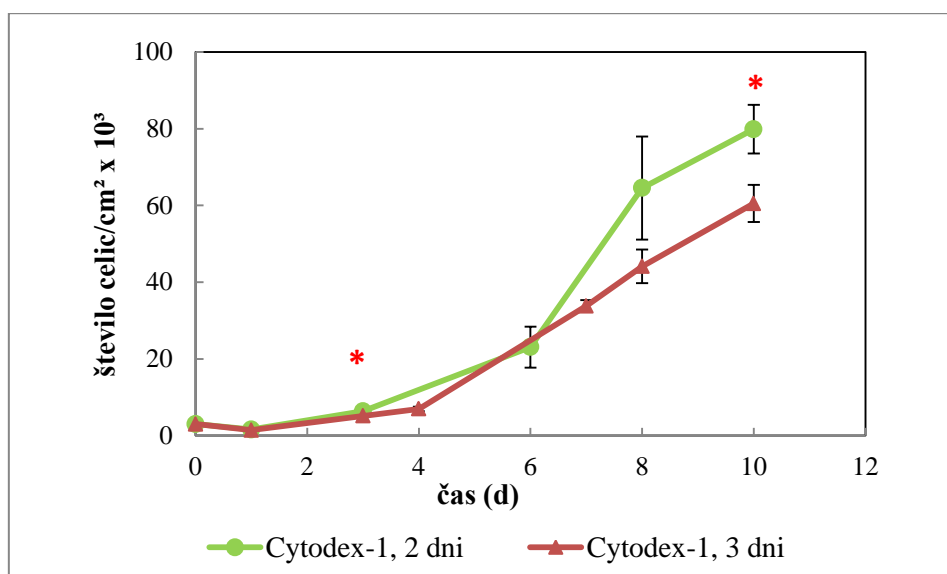


Slika 14: A) Rast celične linije ASC K16 (p8) na *Cytodex-3* pri predinkubaciji MN v GM. Slike od (a-e) ponazarjajo prvi, tretji, šesti, osmi in deseti dan gojenja celic na MN v gojilni suspenziji pri 100 x povečavi. B) Rast celične linije ASC K16 (p8) na *Cytodex-3* pri predinkubaciji MN v FBS. Slike od (a-e) ponazarjajo prvi, tretji, šesti, osmi in deseti dan gojenja celic na MN v gojilni suspenziji pri 100 x povečavi.

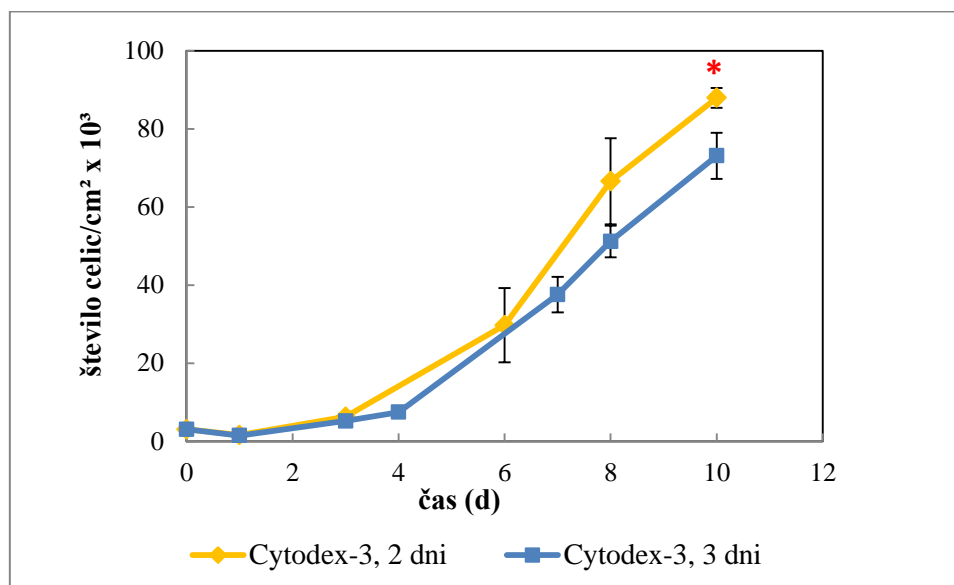
4.2 VPLIV POGOSTOSTI MENJAVE MEDIJA NA KONČNO ŠTEVILO CELIC

ASC smo gojili v gojilnem mediju DMEM z 20 % FBS (GM), ki zagotavlja potrebna hranila za rast in delitev celic. Pri tem smo želeli testirati vpliv pogostosti menjave medija na rast celic gojenih na MN. Celicam, gojenim na MN, smo GM najprej zamenjali vsaka 2 dni, nato pa poskus ponovili z menjavo medija na vsake 3 dni.

Pri pogostejši menjavi medija je bilo opaziti večje končno število celic gojenih na MN (* $p < 0.05$) (Slika 15 in 16).



Slika 15: Primerjava rasti ASC na *Cytodex-1* pri menjavi GM vsaka 2 dni in vsake 3 dni. Vsaka točka predstavlja povprečno število celic/cm² treh neodvisnih poskusov ± standardni odklon.



Slika 16: Primerjava rasti ASC na *Cytodex-3* pri menjavi GM vsaka 2 dni in vsake 3 dni. Vsaka točka predstavlja povprečno število celic/cm² treh neodvisnih poskusov ± standardni odklon.

Rastno kinetiko celic smo pri različni pogosti menjavi medija opredelili enako kot v prvem delu rezultatov. Izračunali smo specifično stopnjo rasti celic, podvojitveni čas celic in stopnjo povečanja celične populacije tekom deset dnevnega gojenja ASC na MN.

Celice na MN pri menjavi medija vsaka 2 dni, kljub višjemu končnemu številu celic, med gojenjem niso imele statistično značilne povečane specifične stopnje rasti celic (Preglednica 16 a, $p > 0.05$). Najvišjo stopnjo rasti celic opazimo pri dnevu 1 za *Cytodex-1* in *Cytodex-3* pri menjavi medija vsaka 2 dni, vendar rezultati niso bili signifikantni.

Preglednica 16a: Rast celic na *Cytodex-1* in *Cytodex-3* pri menjavi medija vsaka 2 dni in vsake 3 dni. Razlike v rasti celic so podane s specifično stopnjo rasti celic v enoti h^{-1} .

Specifična stopnja rasti celic (h^{-1})						
dnevi	Cy-1 2 dni	Cy-1 3 dni	Cy-3 2 dni	Cy-3 3 dni	<i>p</i> (a)	<i>p</i> (b)
1	0.0163	0.0154	0.0167	0.0163	0.126	0.471
3	0.0105	0.0103	0.0110	0.0114	0.316	0.568
4	n.p.	0.0089	n.p.	0.0096	n.p.	n.p.
6	0.0052	n.p.	0.0047	n.p.	n.p.	n.p.
7	n.p.	0.0024	n.p.	0.0026	n.p.	n.p.
8	0.0009	0.0012	0.0012	0.0013	0.639	0.829

Cy-*Cytodex*, n.p.- ni podatkov; dnevi 1-8 predstavljajo število pritrjenih celic v primerjavi s končnim številom celic.

p (a) – pričakovane vrednosti za *Cytodex-1* pri različni pogosti menjavi GM

p (b) – pričakovane vrednosti za *Cytodex-3* pri različni pogosti menjavi GM

Menjava gojilnega medija vsaka 2 dni ni vplivala na hitrejši čas podvajanja celic na MN v primerjavi z menjavo medija vsake 3 dni (Preglednica 16 b, $p > 0.05$).

Preglednica 16 b: Hitrost podvajanja celic tekom deset dnevnega gojenja na MN. Podvojitveni čas celic je podan v urah (h).

Podvojitveni čas celic (h)						
dnevi	Cy-1 2 dni	Cy-1 3 dni	Cy-3 2 dni	Cy-3 3 dni	<i>p</i> (a)	<i>p</i> (b)
1	42.6	45.1	41.6	42.4	0.129	0.460
3	65.8	67.6	62.9	61.1	0.313	0.565
4	n.p.	78.3	n.p.	71.8	n.p.	n.p.
6	133.8	n.p.	157.4	n.p.	n.p.	n.p.
7	n.p.	299.5	n.p.	283.5	n.p.	n.p.
8	1005.9	575.4	770.3	516.3	0.379	0.496

Cy-*Cytodex*, n.p.- ni podatkov; dnevi 1-8 predstavljajo število pritrjenih celic v primerjavi s končnim številom celic.

p (a) – pričakovane vrednosti za *Cytodex-1* pri različni pogosti menjavi GM

p (b) – pričakovane vrednosti za *Cytodex-3* pri različni pogosti menjavi GM

Celice na MN so pri menjavi medija vsaka 2 dni dosegle povečanje celične populacije za 50-krat pri *Cytodex-1* in za 54.8-krat pri *Cytodex-3*, in sicer glede na razmerje med končnim številom celic in številom pritrjenih celic (dan 1). Pri menjavi medija vsake 3 dni se je celična populacija povečala za manjkrat, vendar razlika ni bila statistično značilna (preglednica 16 c, $p > 0.05$). Med gojenjem se je stopnja povečanja celične populacije na MN zmanjševala.

Preglednica 16 c: Stopnja povečanja celične populacije na MN glede na razmerje med končnim in začetnim številom pritrjenih celic.

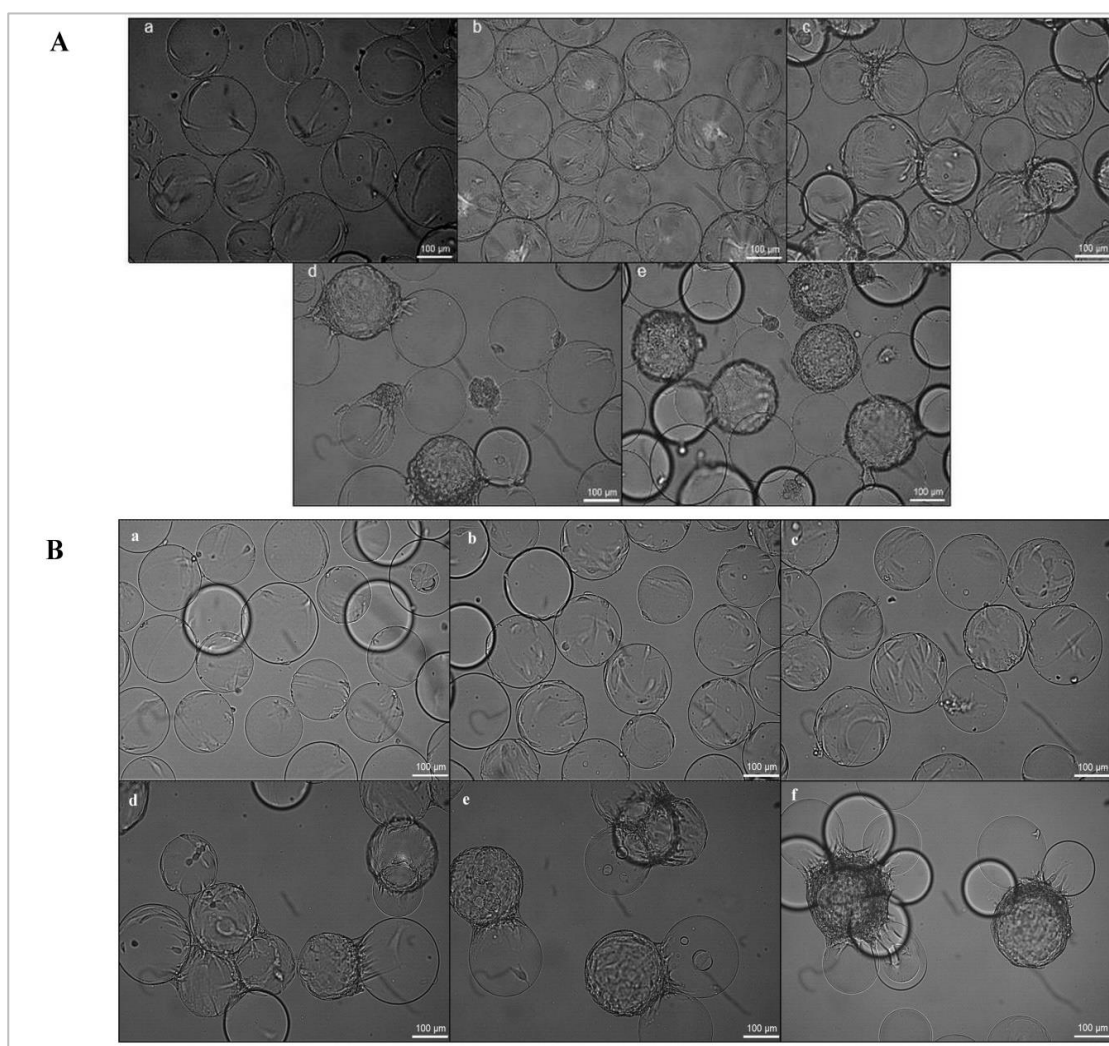
Stopnja povečanja celične populacije						
dnevi	Cy-1 2 dni	Cy-1 3 dni	Cy-3 2 dni	Cy-3 3 dni	<i>p</i> (a)	<i>p</i> (b)
1	50.0	40.4	54.8	51.0	0.125	0.495
3	12.56	11.8	14.2	15.3	0.319	0.572
4	n.p	8.4	n.p	10.1	n.p	n.p
6	3.55	n.p	3.2	n.p	n.p	n.p
7	n.p	1.8	n.p	1.9	n.p	n.p
8	1.27	1.3	1.4	1.4	0.688	0.897

Cy-*Cytodex*, n.p.- ni podatkov; dnevi 1-8 predstavljajo število pritrjenih celic v primerjavi s končnim številom celic.

p (a) – pričakovane vrednosti za *Cytodex-1* pri različno pogosti menjavi GM

p (b) – pričakovane vrednosti za *Cytodex-3* pri različno pogosti menjavi GM

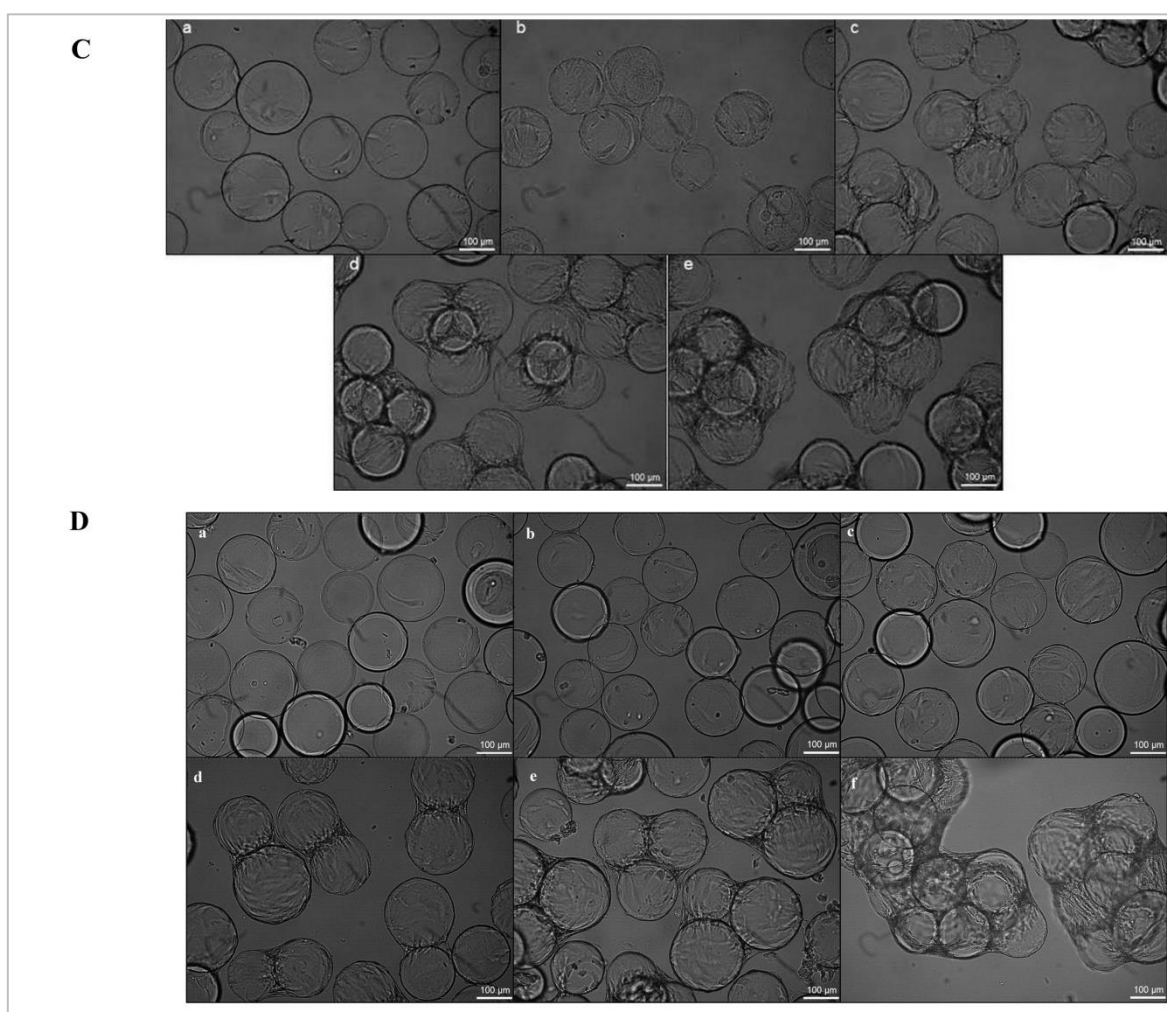
Na sliki 17 so predstavljeni rezultati rasti ASC na *Cytodex-1* pri menjavi medija vsaka 2 dni (Slika 17 A) in menjavi medija vsake 3 dni (Slika 17 B). Ko celice na MN dožejo stanje konfluente (šesti dan), se posledično oblikujejo celični skupki. Večje število celičnih skupkov pri menjavi medija na 2 dni ponazarja večje končno število celic, v primerjavi z menjavo medija na 3 dni, kar sovpada z grafičnimi prikazi (Slika 15).



Slika 17: A) Prikaz rasti ASC K16 (p8) na MN *Cytodex-1* po menjavi medija na 2 dni. Slike od (a-e) ponazarjajo prvi, tretji, šesti, osmi in deseti dan gojenja celic pri 100 x povečavi.

B) ASC K16 (p8) na MN *Cytodex-1* po menjavi medija na 3 dni. Slike od (a-f) ponazarjajo prvi, tretji, četrti, sedmi, osmi in deseti dan gojenja celic pri 100 x povečavi.

Slika 18 predstavlja rast ASC na *Cytodex-3* pri menjavi medija vsaka 2 dni (Slika 18 C) in vsake 3 dni (Slika 18 D). Ko celice na MN dosežejo stanje konfluente, se ti posledično začnejo zlepljati med seboj. Pri menjavi medija na 2 dni je opaziti, da se MN začnejo zlepljati že tretji dan gojenja (Slika 18 C_c) in popolnoma prerastejo MN šesti dan gojenja. Pri menjavi medija vsake 3 dni celice nekoliko kasneje prerastejo MN (Slika 18 D_{d-e}), kar kaže na to, da rastejo počasneje kot pri menjavi medija vsaka 2 dni (Slika 16).

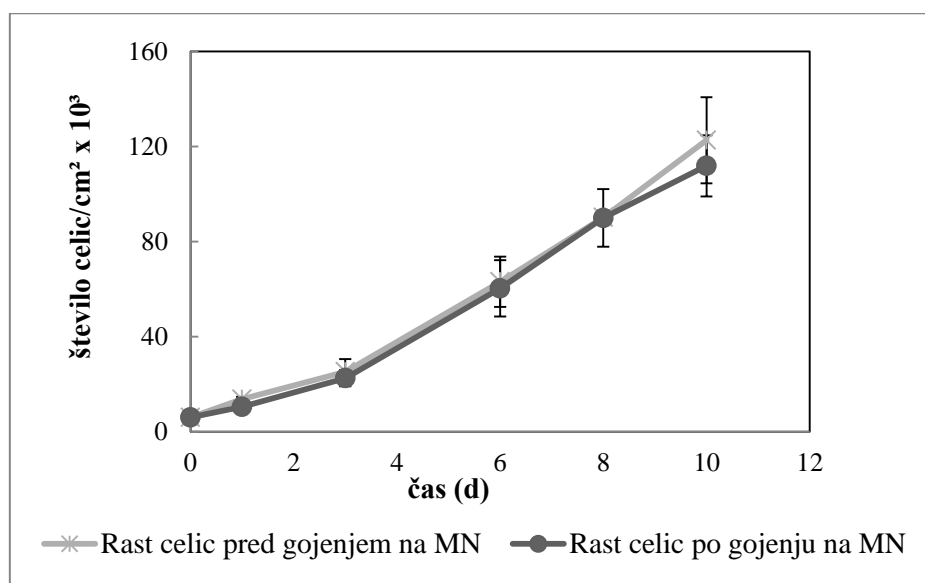


Slika 18: C) Prikaz rasti ASC K16 (p8) na MN *Cytodex-3* po menjavi medija na 2 dni. Slike od (a-e) ponazarjajo prvi, tretji, šesti, osmi in deseti dan gojenja celic pri 100 x povečavi.

D) ASC K16 (p8) na MN *Cytodex-3* po menjavi medija na 3 dni. Slike od (a-f) ponazarjajo prvi, tretji, četrti, sedmi, osmi in deseti dan gojenja celic pri 100 x povečavi.

4.3 TESTIRANJE PROLIFERACIJSKEGA POTENCIALA CELIC PO GOJENJU NA MN

ASC so bile sočasno nasajene v adherentni enoslojni plasti pri pasaži 6 in na MN. Po 10-dnevnem gojenju na MN v gojilni suspenziji smo celice pri pasaži 7 ponovno nasadili v adherentno enoslojno plast. Pri tem smo želeli preveriti proliferacijski potencial celic po gojenju na MN. Rezultati so pokazali, da celice tudi po gojenju na MN ohranijo enak proliferacijski potencial kot celice, ki smo jih gojili v adherentni enoslojni plasti. Za poskus smo upoštevali enake pogoje gojenja ASC v obeh primerih. Celice so bile nasajene pri gostoti 6000 celic/cm^2 in gojene 10 dni v celičnem inkubatorju s 5 % CO_2 in $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Za vsako ponovitev poskusa smo uporabili enak tip MN.



Slika 19: Proliferacijski potencial celic po gojenju na MN v primerjavi z rastjo celic pred gojenjem na MN. Vsaka točka predstavlja povprečno število celic/cm² treh neodvisnih poskusov ± standardni odklon.

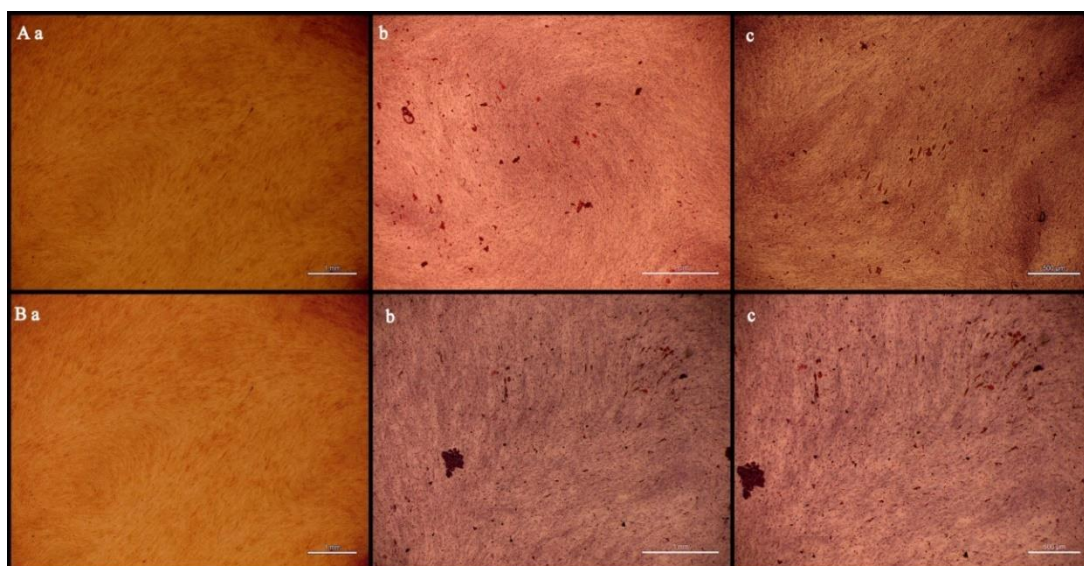
4.4 TESTIRANJE DIFERENCIACIJSKEGA POTENCIALA PRED IN PO GOJENJU CELIC NA MN

Diferenciacijo ASC v adipocite, osteocite in hondrocite smo izvedli na celični liniji K16, ki je bila gojena v adherentni enoslojni plasti. Diferenciacijo smo ponovili še enkrat pri celicah, ki so bile predtem gojene na MN.

4.4.1 Diferenciacija ASC v adipocite

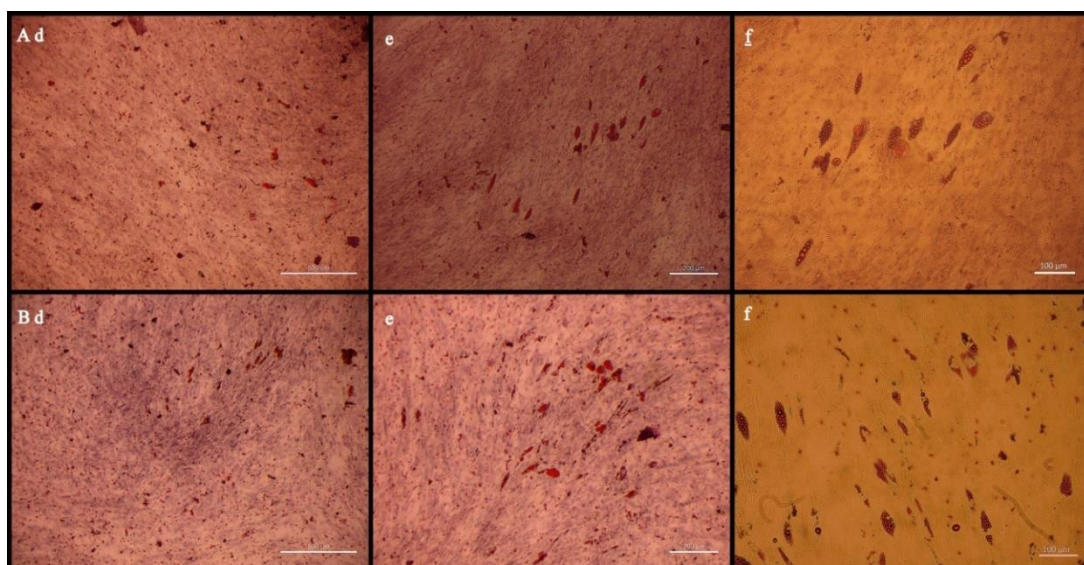
ASC smo izpostavili indometacinu, ki je celicam omogočil tvorbo maščobnih vakuol. Uspešnost diferenciacije smo potrdili z barvanjem »*Oil Red O*« - lipofilnim barvilom, ki specifično obarva maščobe.

Sliki 20 in 21 predstavljata rezultate testiranja diferenciacijskega potenciala pred in po gojenju celic na MN pri različnih povečavah. Prikazana je primerjava ASC, ki so bile gojene v adherentni enoslojni plasti (Slika 20 in 21 A_{a-f}) in ASC, ki so bile predtem gojene na MN (Slika 20 in 21 B_{a-f}). V obeh primerih so se ob izpostavitvi celic indometacinu le-te diferencirale v adipoblaste in tvorile začetke maščobnih vakuol. Obseg in oblika diferenciranih celic je bila pred in po gojenju celic na MN primerljiva. Pri kontrolnih vzorcih do diferenciranih celic v adipogeni tip ni prišlo.



Slika 20: A) Indukcija adipogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 7 pred gojenjem na MN; (a) negativna kontrola pri 2 x povečavi (b) celice po izpostavitvi adipogenih diferenciranih dejavnikov in po barvanju z "Oil Red O" pri 3.2 x povečavi (c) diferencirane celice pri 4 x povečavi.

B) Indukcija adipogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 8 po gojenju na MN; (a) negativna kontrola pri 2 x povečavi, (b) celice po izpostavitvi adipogenih diferenciranih dejavnikov in po barvanju z "Oil Red O" pri 3.2 x povečavi (c) diferencirane celice pri 4 x povečavi.



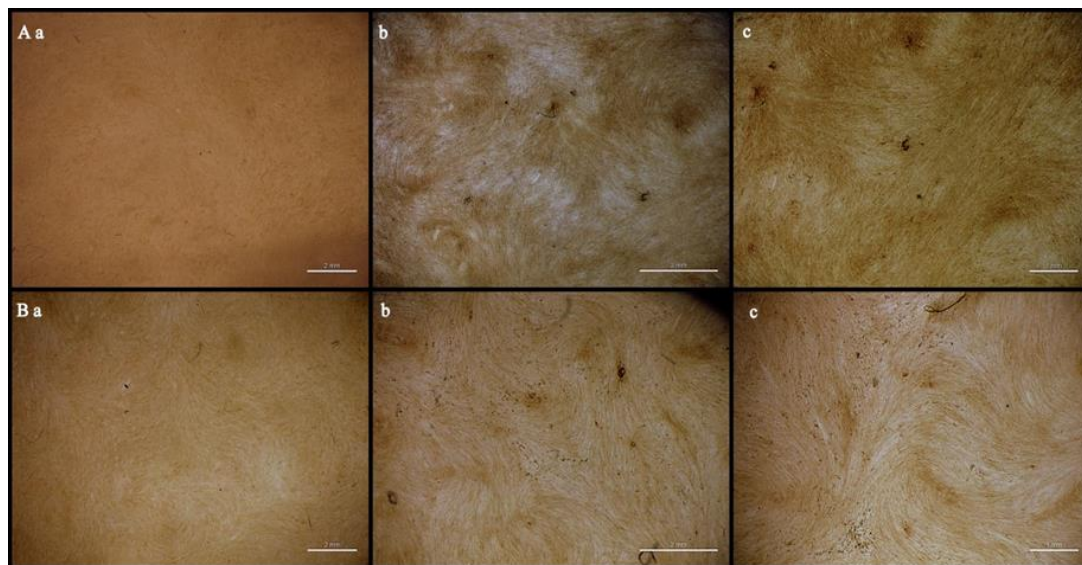
Slika 21: A) Indukcija adipogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 7 pred gojenjem na MN; (d-f) celice po izpostavitvi adipogenih diferenciranih dejavnikov in po barvanju z "Oil Red O" pri 5, 8 in 10 x povečavi.

B) Indukcija adipogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 8 po gojenju na MN; (d-f) celice po izpostavitvi adipogenih diferenciranih dejavnikov in po barvanju z "Oil Red O" pri 5, 8 in 10 x povečavi.

4.4.2 Diferenciacija ASC v osteocite

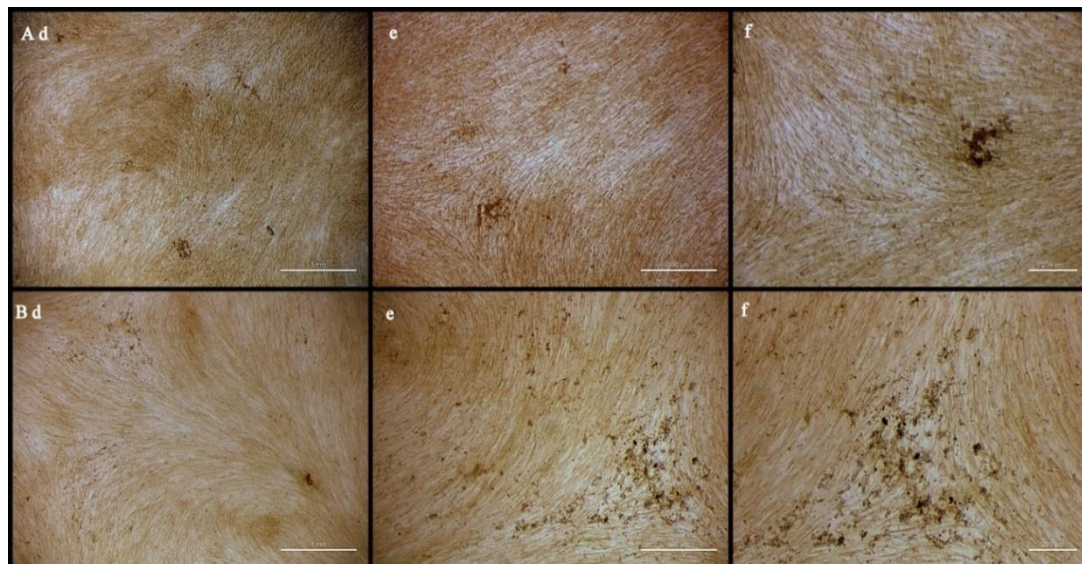
ASC smo izpostavili indukcijskemu mediju z vsebnostjo deksametazona, askorbinske kisline in glicerofosfata, ki inducira celice v osteogeno diferenciacijo. Diferencirane celice osteogenega tipa tvorijo kalcijeve depozite, ki so ključni element kostnega tkiva. Uspešnost diferenciacije smo potrdili z barvanjem celic po metodi *von Kossa*, ki specifično obarva kalcijeve depozite.

Sliki 22 in 23 predstavljata rezultate testiranja diferenciacijskega potenciala pred in po gojenju celic na MN pri različnih povečavah. Prikazana je primerjava ASC, ki so bile gojene v adherentni enoslojni plasti (Slika 22 in 23 A_{a-f}) in ASC, ki so bile predtem gojene na MN (Slika 22 in 23 B_{a-f}). V obeh primerih so se ob izpostavitvi indukcijskemu mediju v celicah pojavili kalcijevi depoziti, ki so se obarvali črno. Diferencirane celice so se morfološko spremenile v primerjavi z nediferenciranimi celicami kontrolne skupine. Postale so bolj okrogle, manjše in izgubile so značilno podolgovato obliko. Pri kontrolnih vzorcih do nastanka kalcijevih depozitov v celicah ni prišlo. Osteogeneza je potekla bolj intenzivno pri celicah, ki so bile gojene na MN, kar prikazuje večja količina kalcijevih depozitov v teh celicah.



Slika 22: A) Indukcija osteogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 7 pred gojenjem na MN; (a) negativna kontrola pri 1 x povečavi (b-c) nastanek črno obarvanih kalcijevih depozitov v celicah po barvanju po "Von Kosa" pri 1.6 in 2 x povečavi.

B) Indukcija osteogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 8 po gojenju na MN; (a) negativna kontrola pri 1 x povečavi, (b-c) nastanek črno obarvanih kalcijevih depozitov v celicah po barvanju po "Von Kosa" pri 1.6 in 2 x povečavi.



Slika 23: A) Indukcija osteogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 7 pred gojenjem na MN; (d-f) nastanek črno obarvanih kalcijevih depozitov v celicah po barvanju po "Von Kosa" pri 3.2, 5 in 8 x povečavi.

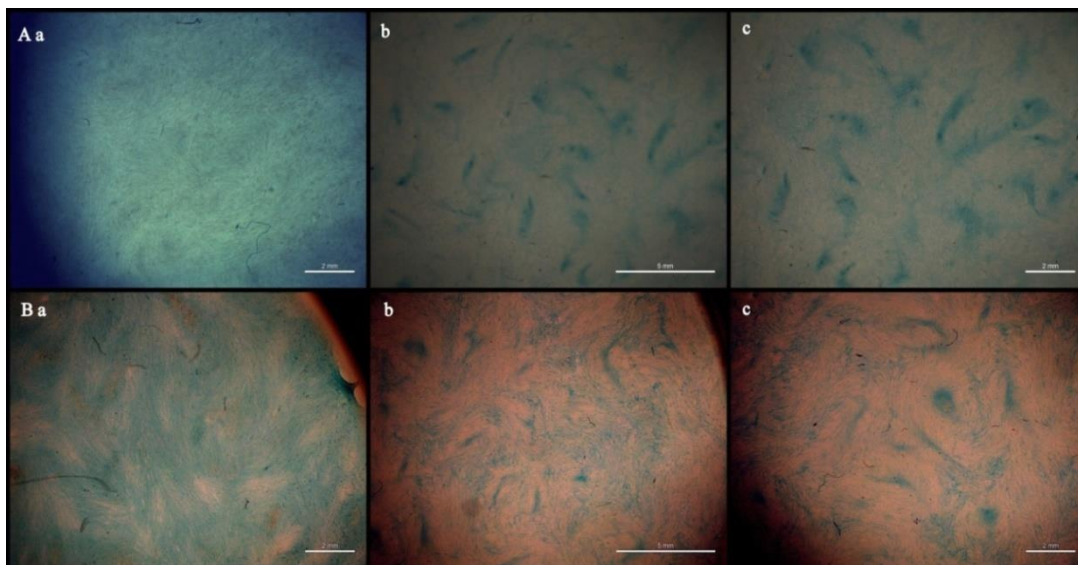
B) Indukcija osteogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 8 po gojenju na MN; (d-f) nastanek črno obarvanih kalcijevih depozitov v celicah po barvanju po "Von Kosa" pri 3.2, 5 in 8 x povečavi.

4.4.3 Diferenciacija ASC v hondrocite

ASC smo izpostavili indukcijskemu mediju z vsebnostjo TGF- β 3 in askorbinske kisline, ki je omogočil nastanek elementov zunajceličnega matriksa hrustančnega tkiva. Uspešnost diferenciacije smo potrdili z barvanjem celic z barvilom *Alcian Blue*, ki specifično obarva zunajcelični matriks hrustanca, predvsem glukozaminoglikane in mukopolisaharide.

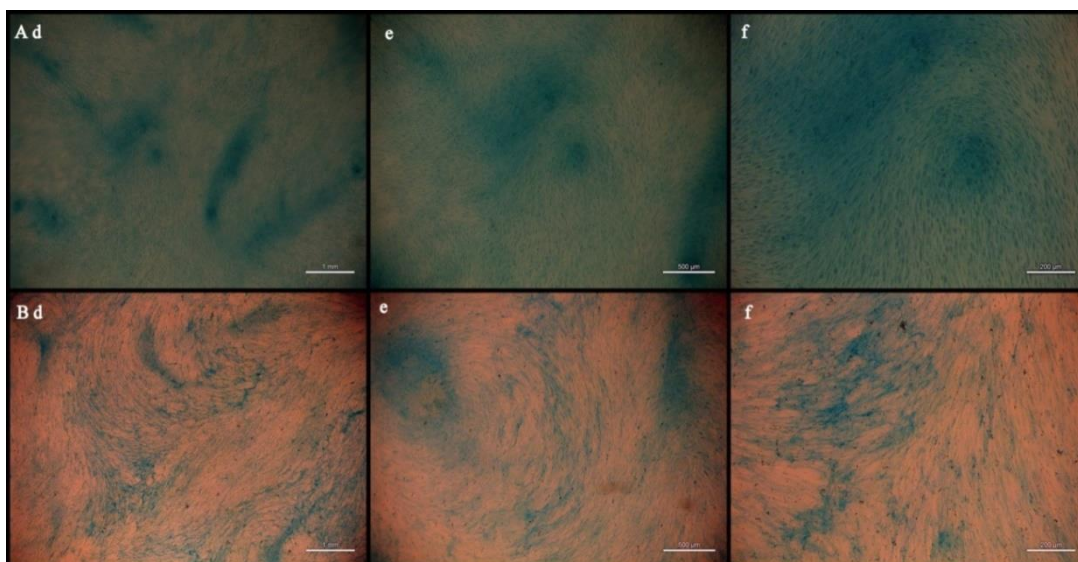
Sliki 24 in 25 predstavljata rezultate testiranja diferenciacijskega potenciala pred in po gojenju celic na MN pri različnih povečavah. Prikazana je primerjava ASC, ki so bile gojene v adherentni enoslojni plasti (Slika 24 in 25 A_{a-f}) in ASC, ki so bile predtem gojene na MN (Slika 24 in 25 B_{a-f}). Celice smo pobarvali z barvilom *Alcian Blue* za detekcijo elementov zunajceličnega matriksa hrustanca. Pri celicah, ki smo jih izpostavili TGF- β 3 in askorbinski kislini, so se pojavili skupki celic, ki vsebujejo elemente zunajceličnega matriksa hrustanca.

Pri kontrolnih vzorcih so celice ostale podolgovatih, vretenastih oblik, saj ni prišlo do nastanka elementov zunajceličnega matriksa hondroblastov. V obeh primerih, tako pred in po gojenju celic na MN je hondrogeneza potekla v podobnem obsegu.



Slika 24: A) Indukcija hondrogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 7 pred gojenjem na MN; (a) negativna kontrola pri 1 x povečavi (b-c) celice po izpostavitvi diferenciacijskih dejavnikov in po barvanju z "Alcian blue"; temneje obarvana področja predstavljajo elemente zunajceličnega matriksa hondroblastov pri 0.8 in 1 x povečavi.

B) Indukcija hondrogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 8 po gojenju na MN; (a) negativna kontrola pri 1 x povečavi (b-c) celice po izpostavitvi diferenciacijskih dejavnikov in po barvanju z "Alcian blue"; temneje obarvana področja predstavljajo elemente zunajceličnega matriksa hondroblastov pri 0.8 in 1 x povečavi.



Slika 25: A) Indukcija hondrogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 7 pred gojenjem na MN; (d-f) celice po izpostavitvi diferenciacijskih dejavnikov in po barvanju z "Alcian blue"; temneje obarvana področja predstavljajo elemente zunajceličnega matriksa hondroblastov pri 2, 4 in 8 x povečavi.

B) Indukcija hondrogene diferenciacije ASC K16 pri pasaži 8 po gojenju na MN; (d-f) celice po izpostavitvi diferenciacijskih dejavnikov in po barvanju z "Alcian blue"; temneje obarvana področja predstavljajo elemente zunajceličnega matriksa hondroblastov pri 2, 4 in 8 x povečavi.

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIV PREDINKUBACIJE MN NA RAST IN KONČNO ŠTEVILO CELIC

Razvoj MN predstavlja velik napredek v gojenju adherentnih kultur, med katere uvrščamo tudi MMC. Te se vedno bolj uspešno uporabljajo v klinične namene, kjer pa lahko potrebujejo tudi do milijardo teh celic. Klasične metode gojenja celic v adherentnih enoslojnih plasteh takšne količine ne morejo omogočiti, prav tako imajo številne druge omejitve. Celice imajo v adherentnih enoslojnih plasteh omejeno rastno površino, zato jih je potrebno ob doseženi 90 % kofluenci presaditi v nove posode. Pri tem se večja možnost kontaminacij kot tudi otežuje kontrolirano spremljanje gojenja celic (Schop in sod., 2008). Ena izmed zelo obetavnih alternativnih metod gojenja MMC je uporaba biorektorskih sistemov, ki temeljijo na MN (Frauenschuh in sod., 2007). Tehnologija gojenja celic na MN v mešalnih bioreaktorjih združuje fleksibilen način gojenja celic, nadzor nad zmogljivostjo biorektorske kulture in enostavno spremljanje samega procesa gojenja celic (Rafiq in sod., 2013).

Preden začnemo celice gojiti na MN, je potrebno izbrati ustrezen MN in bioreaktor, v katerem bomo celice gojili. Zaradi dinamičnega sistema rasti celic na MN v mešalnih bioreaktorjih je potrebna natančna optimizacija pogojev gojenja celic. Prvi ključni korak pri nasaditvi celic na MN je njihova uspešna pritrditev. Pri tem igra pomembno vlogo predinkubacija MN. V predhodnih študijah so pokazali, da predinkubacija MN v gojilnem mediju DMEM z 20 % FBS (GM) z dodanimi rastnimi faktorji poveča pritrditev celic v primerjavi s predinkubacijo v mediju, ki nima dodanih faktorjev (Ng in sod., 1996). Pri tem je potrebno upoštevati sestavo MN, saj je pritrditev celic na MN odvisna od elektostatske interakcije med celično površino in površino MN. V naši nalogi smo testirali vpliv predinkubacije MN v GM, ki ima nizko stopnjo seruma, z dodanim 20 % FBS in le v čistem FBS. Pri tem smo predpostavili, da bo čisti FBS zaradi večje vsebnosti rastnih dejavnikov kot GM omogočil boljšo pritrditev in rast celic na MN.

Grafični rezultati (Sliki 10 in 11) in izračuni vpliva predinkubacije MN na rast celic (Preglednica 15 a, b, c) kažejo, da predinkubacija MN *Cytodex-1* in *Cytodex-3* v čistem FBS ni omogočila boljše rasti in večjega števila ASC v primerjavi s predinkubacijo v GM. Celice v primeru predinkubacije MN v FBS niso imele višje specifične stopnje rasti, prav tako se tekom gojenja na MN niso hitreje podvojevale. Stopnja povečanja celične populacije na MN ni presegala stopnjo pri predinkubaciji MN v GM ($p > 0.05$). Ker površino *Cytodex-1* prekrivajo hidrofилne pozitivno nabite DEAE skupine, ki privlačijo tudi proteine in rastne faktorje iz gojilnega medija, je to lahko preprečilo pritrditev in nadaljo rast celic. Površina *Cytodex-3* je obdana s tankim slojem denaturiranega kolagena, kar prav tako privlači rastne faktorje iz seruma. Ko smo MN preinkubirali le v čistem FBS, so se rastni faktorji preferenčno vezali na površino MN in zavzeli nekatera mesta na površini MN. Zaradi interakcije med rastnimi faktorji in površino MN so celice imele zmanjšano afiniteto vezave na MN in posledično zavirano rast.

Slikovni prikaz ponazarja grafične rezultate vpliva predinkubacije MN na rast celic. Celice gojene na MN so dosegle stanje konfluente šesti dan gojenja. Indikator stanja konfluente je bila pri *Cytodex-1* tvorba celičnih skupkov (Slika 13) in pri *Cytodex-3* povezovanje celic na MN s sosednjimi MN (Slika 14). Pri predinkubaciji MN v FBS je opaziti manj celičnih skupkov in manj med seboj povezanih MN. Sliki 13 in 14 tako potrjujeta, da predinkubacija MN v 20 % FBS ni omogočila izboljšane rasti celic, kvečjemu je njihovo rast zavirala.

Glede na rezultate smo ovrgli našo hipotezo, da bo predinkubacija MN v čistem FBS izboljšala rast celic in povečala njihovo končno število. V primeru *Cytodex-3* je bilo končno število statično značilno večje pri predinkubaciji MN v GM kot pa v čistem FBS (Slika 11). V nadaljevanju smo pri gojenju celic na MN le-te predinkubirali v GM.

Pri optimizaciji gojenja celic na MN smo uporabili dva različna tipa MN, med katerima ni bilo razlik v rasti celic (Slika 12). MN *Cytodex-1* in *Cytodex-3* smo izbrali na podlagi predhodno opravljenih študij, kjer so pokazali, da sta primerna za gojenje MMC iz različnih virov (Chen in sod., 2013). Izmed drugih komercialno dostopnih MN sta imela

Cytodex-1 in *Cytodex-3* visoko učinkovitost naseditve MMC (Schop in sod. 2010; Timmins in sod., 2012). Med *Cytodex-1* in *Cytodex-3* ni bilo opaziti signifikantne razlike v rasti ASC (Preglednica 15 a, b, c; $p(c) > 0.05$). Naši rezultati so tako pokazali, da sta oba tipa MN enako primerna za gojenje humanih ASC.

5.2 VPLIV POGOSTOSTI MENJAVE MEDIJA NA KONČNO ŠTEVILO CELIC

Celicam na MN v gojilni suspenziji smo zamenjali 50 % starega GM s svežim vsaka 2 dni in vsake 3 dni. Pri menjavi GM vsaka 2 dni je bilo končno število celic/cm² na MN statistično značilno višje kot pri menjavi medija vsake 3 dni (Sliki 15 in 16). Slikovni prikazi ponazarjajo grafične rezultate vpliva pogostosti menjave GM. Pri celicah na *Cytodex-1* je pri menjavi GM vsaka 2 dni ob koncu gojenja (deseti dan) opaziti več celičnih skupkov (*Cytodex-1*; Slika 17) kot pri menjavi medija vsake 3 dni. Pri *Cytodex-3* je ob menjavi medija vsaka 2 dni že šesti dan opaziti združenje po dva ali tri MN s celicami. Pri menjavi medija vsake 3 dni se MN začnejo med seboj povezovati dan kasneje (sedmi dan gojenja) (*Cytodex-3*; Slika 18). Mešalne steklenke, v katerih gojimo celice na MN, omogočijo kontinuirano mešanje GM. S tem je izboljšana izmenjava plinov ter hranil iz GM. Metaboliti kot so amoniak so v večjem volumnu GM bolje razredčeni, kar prispeva k večjim virom energije (v obliki glukoze in glutamina). Pri pogostejši menjavi GM so celice tako boljše oskrbovane s potrebnimi nutrienti, kar posledično vpliva na višje končno število celic pri pogostejši menjavi medija (Sliki 15 in 16).

Do podobnih zaključkov so prišli tudi Schop in sod. (2008), ki so pokazali, da pogosta menjava GM (30 % svežega medija vsake 3 dni) pri MMC gojenih na MN (*Cytodex-1*) vpliva na izboljšano eksponentno rast celic. V študiji so tudi pokazali, da je pri celicah na MN ob pogosti menjavi medija zmanjšana proizvodnja laktata iz glukoze, kar pa ugodneje vpliva na celični metabolizem. Da bi pokazali podroben vpliv časovne menjave medija na končno število celic, bi morali dodatno izmeriti porabo hranil in proizvodnjo metabolitov (vsebnost laktata) pri različni menjavi medija.

Kljub signifikantno višjemu končnemu številu celic pri menjavi medija vsaka 2 dni, pa ni značilnih sprememb v rasti celic med gojenjem pri različno pogosti menjavi gojilnega medija. Izračuni specifične stopnje rasti celic, podvojitvenega časa celic in stopnje povečanja celične populacije na MN kažejo, da menjava medija vsaka 2 dni ni izboljšala rastne kinetike celic (Preglednica 16 a, b, c; $p > 0.05$). Do statistično značilnih razlik v rastni kinetiki celic najverjetneje ni prišlo, ker so celice tudi pri menjavi medija vsake 3 dni še vedno imele na voljo dovolj hranil, da so lahko rastle in se podvojevale. Kljub temu je pogostejša menjava medija omogočila boljše pogoje za namnožitev večjega števila celic. Glede na rezultate lahko potrdimo, da je bilo ob pogostejši menjavi medija večje končno število celic, medtem ko proliferacija celic med gojenjem ni bila statistično različna.

5.3 TESTIRANJE PROLIFERACIJSKEGA POTENCIALA CELIC PO GOJENJU NA MN

Proliferacijski potencial ASC, gojenih *in vitro* v adherentni enoslojni plasti, je odvisen od številnih gojilnih parametrov, kot so GM, ustrežna menjava GM, gostota nasajenih celic, oskrba s plini (O_2 , CO_2) in pH. Ker gojenje celic na MN zahteva spremenjen način gojenja kot klasično adherentno gojenje v enoslojnih plasteh, lahko različni parametri spremenijo proliferacijski potencial. Ključni dejavniki, ki lahko vplivajo na proliferacijski potencial pri *in vitro* gojenju ASC na MN, so predinkubacija MN, GM, oskrba s plini, hitrost mešanja MN v suspenziji, redoks potencial, pH ipd. V naši nalogi smo pri gojenju celic na MN ključne dejavnike optimizirali in pokazali, da so ASC po gojenju na MN ohranile enak proliferacijski potencial v adherentni enoslojni plasti, kot so ga imele pred nasaditvijo na MN (Slika 19). S tem smo potrdili hipotezo, da gojenje celic na MN ne spremeni njihovega proliferacijskega potenciala.

5.4 TESTIRANJE DIFERENCIACIJSKEGA POTENCIALA PRED IN PO GOJENJU CELIC NA MN

Mezenhimske matične celice, med katere uvrščamo tudi ASC, se glede na svoj izvor lahko uspešno diferencirajo v osteoblaste, adipocite in hondrocite (Chen in sod., 2013), kar smo preverili tudi v naši nalogi.

Adipogeno diferenciacijo ASC smo določili z nastankom diferenciranih celic, iz katerih se oblikujejo maščobne vakuole. Maščobne vakuole so se po barvanju z »*Oil Red O*« obarvale rdečo (Slika 20 in 21). Fenotip maščobnih celic se je pojavil po 21-dnevnem gojenju ASC v indukcijskem mediju, ki je vseboval indometacin. Celična linija ASC K16 je pokazala uspešen diferenciacijski potencial, kar smo tudi predvidevali, glede na njen originalen izvor iz maščevja. Adipogeni diferenciacijski potencial celic smo v enakem obsegu potrdili tako pri adherentni kulturi kot pri celicah, ki so bile predtem gojene na MN.

Osteogena diferenciacija ASC je potekla v osteogenem mediju, ki je vseboval deksametazon, askorbinsko kislino in glicerolfosfat. Po 10-20 dnevnom gojenju celic v osteogenem mediju so se v celicah pojavili črno obarvani kalcijevi depoziti, ki smo jih zaznali z barvanjem po *Von Kossa*. Kalcijevi depoziti predstavljajo značilne elemente kostnega tkiva in so pokazatelji uspešne osteogene diferenciacije. Sliki 22 in 23 prikazujeta uspešno osteogeno diferenciacijo pri adherentni kulturi in pri celicah, ki so bile predhodno gojene na MN. Pri celični kulturi, ki je bila gojena na MN, se je pojavilo bistveno več črno obarvanih kalcijevih depozitov kot pri adherentni kulturi. Za bolj natančne rezultate izboljšane osteogene potenciala celic iz MN bi morali poskus ponoviti in določiti delež kalcijevih depozitov v obeh primerih.

Pri hondrogeni diferenciaciji ASC smo celice gojili v hondrogenem mediju, ki je vseboval TGF- β 3 in askorbinsko kislino. Po 21-ih dneh gojenja so se pojavili elementi zunajceličnega matriksa hrustančnega tkiva, ki smo jih detektirali z barvanjem z *Alcian Blue*. Sliki 24 in 25 prikazujeta uspešno diferenciacijo ASC v hondrocite, tako pri adherentni kulturi kot pri celicah, ki so bile predhodno gojene na MN. Oba primera hondrogene diferenciacije prikazujeta enak obseg nastanka diferenciranih celic hondrogenega tipa.

Z diferenciacijskimi poskusi smo pokazali uspešno diferenciacijo ASC v tri mezodermalne celične linije (adipocite, hondrocite in osteocite). S tem smo potrdili našo hipotezo, da gojenje celic na MN ne zmanjša sposobnost diferenciacije v maščobne, kostne in hrustančne celice. Četudi so celice po gojenju na MN imele višjo

pasajo, je multipotentni potencial ostal enak oziroma je bil pri osteogeni diferenciaciji celo višji kot pri celični liniji nižje pasaže, gojeni v adherentni enoslojni plasti. Vzroke za izboljšan osteogeni potencial ASC gojenih na MN lahko pripišemo izboljšani metodi gojenja celic na MN v primerjavi s klasičnim gojenjem adherentne kulture. Pri gojenju celic na MN v gojilni suspenziji teh ni potrebno presajati v nove kulture, s čemer se izognemo ponavljajoči tripsnizaciji. Celice na MN imajo boljši dostop do hranil, kar vodi do njihove večje preživelosti in funkcionalnosti. Izboljšan diferenciacijski potencial celic gojenih na MN pa se je pokazal le v primeru osteogene diferenciacije, ne pa tudi pri adipogeni in hondrogeni diferenciaciji. Za bolj natančno opredelitev, ali lahko gojenje ASC na MN izboljša diferenciacijski potencial celic, bi morali pokuse ponoviti. Potrebno bi bilo določiti delež diferenciranih celic istih pasaj pred in po gojenju na MN.

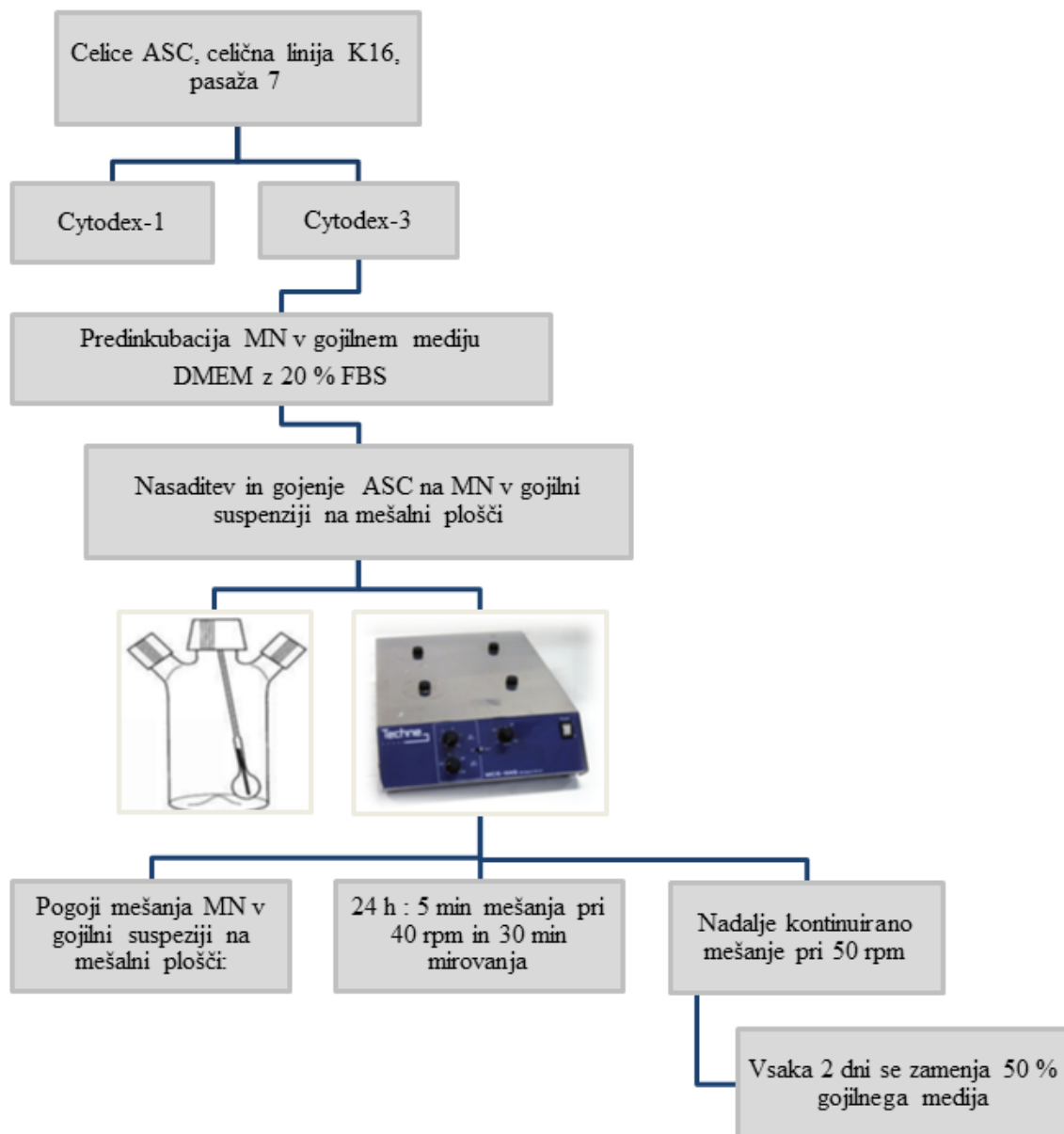
Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Rafiq in sod. (2013) ter potrdili, da tudi velika produkcija MMC, ki so bile gojene na MN v 5 l mešalnem bioreaktorju, ne vpliva na njihovo kakovost in sposobnost diferenciacije v tri ključne mezodermalne celične linije.

Za uporabo MMC v terapevtske namene je njihova sposobnost uspešne diferenciacije ključnega pomena. Protokoli za diferenciacijo celic v specifične celične tipe vključujejo številne vmesne postopke. To predstavlja dodaten izziv za diferenciacijo MMC na MN v večjih bioreaktorjih. V prihodnje se usmerja v združevanje rasti in diferenciacije MMC na MN znotraj bioreaktorskih sistemov.

6 SKLEPI

- Predinkubacija MN v serumu govejega zarodka (čisti FBS) ni pripomogla k izboljšani rasti in večjem končnem številu ASC v primerjavi s predinkubacijo MN v gojilnem mediju DMEM z 20 % FBS (GM).
- Različna tipa mikronosilcev Cytodex (*Cytodex-1* in *Cytodex-3*) nista pokazala značilnih razlik v rasti in končnem številu celic.
- Pogostejša menjava gojilnega medija v gojilni suspenziji MN omogoči večje končno število ASC.
- ASC po gojenju na MN ohranijo enak proliferacijski potencial kot pred gojenjem na MN.
- ASC po gojenju na MN ohranijo svoj adipogeni, osteogeni in hondrogeni potencial v primerjavi z adherentno kulturo. V primeru osteogene diferenciacije je bil diferenciacijski potencial po gojenju na MN celo nekoliko izboljšan.

Optimizirani pogoji gojenja mezenhimskih matičnih celic iz maščevja na mikronosilcih v mešalnem bioreaktorju



7 POVZETEK

Gojenje celic na mikronosilcih (MN) v gojilni suspenziji predstavlja izboljššan način gojenja adherentnih celic. Ključna prednost je doprinos večjega števila celic, kar je pomemben korak naprej v tkivnem inženirstvu ter za klinično in regenerativno terapijo. Za uspešno pritrnitev in nadaljno rast celic na MN je potrebno izbrati ustrezen tip MN in biorektorski sistem. V magistrski nalogi smo MMC iz maščobnega tkiva (ASC) gojili na *Cytodex-1* in *Cytodex-3* v mešalnih steklenkah.

Cilj naše naloge je bil optimizirati pogoje gojenja ASC na MN v gojilni suspenziji za produkcijo velikega števila celic, ki bi jih lahko potencialno uporabili v terapevtske namene. Testirali smo vpliv različne predinkubacije MN kot tudi vpliv pogostosti menjave medija na končno število celic. Opazili smo, da predinkubacija MN v serumu govejega zarodka (čisti FBS) ni pokazala izboljššane rasti celic. MN smo tako nadalje predinkubirali v gojilnem mediju DMEM z 20 % FBS (GM), ki se je izkazal za bolj primerne. Prav tako je menjava GM vsaka 2 dni omogočila večjo končno število celic v primerjavi z menjavo GM vsake 3 dni. Nadaljni rezultati so pokazali, da so celice tudi po daljšem časovnem gojenju na MN sposobne rasti z enako stopnjo proliferacije kot celice gojene v adherentni enoslojni plasti. Testirali smo tudi diferenciacijski potencial ASC. Celice smo usmerili v diferenciacijo pred in po gojenju na MN z gojenjem le-teh v indukcijskem diferenciacijskem mediju. Diferenciacija v tri mezodermalne celične linije je potekla uspešno, v primeru osteogene diferenciacije pa se je pokazal celo izboljššan diferenciacijski potencial pri celični kulturi predhodno gojeni na MN. MN tako predstavljajo ugodno razmerje med površino in prostornino za rast celic kot tudi podporo za nadaljno proliferacijo in diferenciacijo celic. To je ključnega pomena za uporabo teh celic v celični terapiji in pri transplatacijah. Pri tem je pomembno zagotoviti ustrezne pogoje gojenja celic na MN v gojilni suspenziji, kot je prikazano v shemi. Takšen sistem gojenja nam omogoča zaželeno kvantiteto celic za uporabo v klinične namene.

8 VIRI

- Akiyama K., You Y-O., Yamaza T., Chen C., Tang L., Jin Y., Chen X-D., Gronthos S., Shi S. 2012. Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension. *Stem Cell Research & Therapy*, 3: 40
- Bayram Y., Deveci M., Imirzalioglu N., Soysal Y., Sengezer M. 2005. The cell based dressing with living allogenic keratinocytes in the treatment of foot ulcers: a case study. *British Journal of Plastic Surgery*, 58, 7: 988-996
- Biotechnology and Bioengineering* 2013. 110: 5, 110: C1. doi: 10.1002/bit.24662
- Blüml G. 2007. Microcarrier cell culture technology. V: *Animal cell biotechnology*. 2 nd ed. Pörtner R. (ed.). Totowa, Humana Press, 149-178
- Bone A. J. and Hellerström C. 1980. Culture and growth of free pancreatic islet cells on microcarrier beads. *Diabetologia*, 19: 259A
- Bone A. J. and Swenne I. 1982. Microcarriers: a new approach to pancreatic islet cell culture. *In Vitro*, 18: 141-148
- Chen A., Reuveny S., Oh S. K. 2013. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction. *Biotechnology Advance*, 31, 7: 1032-1046
- Choudhery M. S., Badowski M., Muise A., Pierce J. and Harris D. T. 2014. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *Journal of Translational Medicine*, 12: 8
- Clark J. M. and Hirtenstein M. D. 1981. High yield culture of human fibroblasts on microcarriers: a first step in production of fibroblast-derived interferon (human beta interferon). *Journal of Interferon Research*, 1: 391-400
- Crespi C. L. and Thilly W. G. 1981. Continuous cell propagation using low-charge microcarriers. *Biotechnology Bioengineering*, 23: 983-993
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*, 8, 4: 315-317
- Duijvestein M., Vos A. C. W., Roelofs H., Wildenberg M. E., Wendrich B. B., Verspaget H. W. 2010. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*, 59: 1662-1669
- Fangming Lin 2012. Adipose tissue – derived mesenchymal stem cells: a fat chance of curing kidney disease? *Kidney International*, 82: 731-733

- Frantz S., Bauersachs J., Ertl G. 2009. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovascular Research*, 81, 3: 474-481
- Frauschuh S., Reichmann E., Ibold Y., Goetz P. M., Sittlinger M., Ringe J. 2007. A microcarrier-based cultivation system for expansion of primary mesenchymal stem cells. *Biotechnology Progress*, 23: 187-193
- GE Healthcare 2013. *Microcarrier Cell Culture, Principles and Methods*. Data file 18-1140-62 AC.
http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Microcarrier%20Cell%20Culture.pdf
(20. jan. 2014)
- Gebb C., Clark J. M., Hirtenstein M. D. 1984. Alternative surfaces for microcarrier culture of animal cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 172: 151-167
- Genovese J. A., Spadaccio C., Rivello H. G., Toyoda Y., Patel A. N. 2009. Electrostimulated bone marrow human mesenchymal stem cells produce follistatin. *Cytotherapy*, 11, 4: 448-456
- Gimble J. M., Katz A. J. and Bunnell B. A. 2007. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circulation Research*, 100: 1249-1260, doi: 10.1161/01.RES.0000265074.83288.09: 12 str.
- Goh T. K-P., Zhang Z-Y., Chen A. K-L., Reuveny S., Choolani M., Chan J. K. Y. 2013. Microcarrier culture for efficient expansion and osteogenic differentiation of human fetal mesenchymal stem cells. *BioResearch*, 2, 2: 84-97
- Grayson W. L., Zhao F., Bunnell B., Ma T. 2007. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358, 3, 6: 948-953, doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.054: 6 str.
- Grinnell F. 1978. Cellular adhesiveness and extracellular substrata. *International Review of Cytology*, 53: 65-144
- Hayato K., Rie T., Takeshi K., Shumpei I., Tsuyoshi I. 2014. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in regenerative medicine treatment for liver cirrhosis – focused on efficacy and safety in preclinical and clinical studies. *JSM Regenerative Medicine*, 2, 1: 1012
- Herrmann R., Sturm M., Shaw K., Purtill D., Cooney J., Wright M. 2012. Mesenchymal stromal cell therapy for steroid-refractory acute and chronic graft versus host disease: a phase 1 study. *International Journal of Hematology*, 95: 182-188
- Horst J., Kern M., Ulmer E. 1980. Subcultivation of mammalian cells with a Sephadex derivative instead of proteinases. *European Journal of Cell Biology*, 22: 599

- Horwitz E. M., Gordon P. L., Koo W. K., Marx J. C., Neel M. D., McNall R. Y., Muul L. And Hofmann T. 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 8932-8937, doi: 10.1073/pnas.132252399: 6 str.
- Horwitz E.M., Prockop D.J., Fitzpatrick L.A., Koo W.W., Gordon P.L., Neel M., Sussman M., Orchard P., Marx J. C., Pyeritz R. E., Brenner M. K. 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *National Medicine*, 5: 309-313, doi:10.1038/6529: 5 str.
- Illouz Y.G. 1983. Body contouring by lipolysis: a 5-year experience with over 3000 cases. *Plastic Reconstruction Surgery*, 72: 591-597
- Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49
- Jin Jin H., Kyung Y. B., Kim M., Kwon S. J., Jeon H. B., Choi S. J., Kim S. W., Yang Y. S., Oh W. and Chang J. W. 2013. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 17986-18001, doi: 10.3390/ijms140917986: 15 str.
- Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H., Bieback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24: 1294-1301, doi: 10.1634/stem cells.2005-0342: 8 str.
- Keyser K. A., Beagles K. E., Kiem H. P. 2007. Comparison of mesenchymal stem cells from different tissues to suppress T-cell activation. *Cell Transplant*, 16: 555-562
- Koç O. N., Day J., Nieder M., Gerson S. L., Lazarus H. M., Krivit W. 2002. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of Metachromatic Leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant*, 30: 215-222
- Kurita M. M. D., Shigeura T., Sato K., Gonda K., Harii K., Yoshimura K. 2008. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plastic Reconstruction Surgery*. In press.
- Kuzmina L. A., Petinati N. A., Parovichnikova E. N., Lubimova L. S., Griбанова E. O., Gaponova T. V. 2012. Multipotent mesenchymal stromal cells for the prophylaxis of acute graft-versus-host disease - a phase II study. *Stem Cells International*, 2012: 2018.
- Lakshmiopathy U., Verfaillie C. 2005. Stem cell plasticity. *Blood Review*, 19: 29-38
- Le Blanc K., Ringdén O. 2007. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *Journal of International Medicine*, 262: 509-525

- Lecina M., Ting S., Choo A., Reuveny S., Oh S. 2010. Scalable platform for hESC differentiation to cardiomyocytes in suspended microcarrier cultures. *Tissue Engineering Part C Methods*, 16: 1609-1619
- Liu X., Wang Z., Wang R., Zhao F., Shi P., Jiang Y. 2013. Direct comparison of the potency of human mesenchymal stem cells derived from amnion tissue, bone marrow and adipose tissue at inducing dermal fibroblast responses to cutaneous wounds. *International Journal of Molecular Medicine*, 31: 407-415
- Lock L. T. and Tzanakakis E. S. 2009. Expansion and differentiation of human embryonic stem cells to endoderm progeny in a microcarrier stirred-suspension culture. *Tissue Engineering, Part A*, 15: 2051-2063
- Locke M., Windsor J. and Dunbar P. R. 2009. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ Journal of Surgery*, 79 (4): 235-244, doi: 10.1111/j.1445-2197.2009.04852.x: 10 str.
- Malmgaard L. 2004. Induction and Regulation of IFNs During Viral Infections. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 24, 8: 439-454
- Maroudas N. G. 1975. Adhesion and spreading of cells on charged surfaces. *Journal of Theoretical Biology*, 49: 417-424
- Martin Y., Eldardiri M., Lawrence-Watt D. J., Sharpe J. R. 2011. Microcarriers and their potential in tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B*, 17: 71-80
- Meirelles L. S., Nardi N. B. 2009. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Bioscience*, 14: 4281-4298
- Mizuno H., Tobita M., Uysal A. C. 2012. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*, 30, 5: 804-810, doi: 10.1002/stem.1076: 7 str.
- Motaln H., Schichor C., Lah T. T. 2010. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer*, 116, 11: 2519-2530
- Nardi B. N. in Meirelles L. S. 2006. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, HEP, 174: 249-282
- Nedergaard J., Bengtsson T., Cannon B. 2007. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 293: E444-E452

- Ng F., Boucher S., Koh S., Sastry K. S. R., Chase L., Lakshmipathy U., Choong C., Yang Z., Mohan C. Vemuri M.C., Rao M.S., and Tanavde V. 2008. PDGF, TGF- β , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood*, 112, 2: 295-307
- Ng Y-C., Berry J. M., Butler M. 1996. Optimization of physical parameters for cell attachment and growth on macroporous microcarriers. *Biotechnology Bioengineering*, 50: 627-635
- Nombela-Arrieta C., Ritz J., Silberstein E. L. 2011. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12: 126-131
- Patel A. N. and Genovese J. 2011. Potential clinical applications of adult human mesenchymal stem cell (Prochymal®) therapy. *Stem Cells and Cloning*, 4: 61-72
- Perez R. A., Riccardi K., Altankov G. and Ginebra M. P. 2014. Dynamic cell culture on calcium phosphate microcarriers for bone tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering*. 5: 1-10, doi: 10.1177/2041731414543965: 10 str.
- Rafiq Q. A., Brosnan K. M., Coopman K., Nienow A. W. and Hewitt C. J. 2013. Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. *Biotechnology Letters*, 35: 1233 – 1245, doi 10.1007/s10529-013-1211-9: 13 str.
- Rodbell M., Jones A. B. 1966. Metabolism of isolated fat cells. *Journal of Biological Chemistry*, 241: 140-142
- Rožman P., Jež M. 2009. Matična celica in napredno zdravljenje (napredno zdravljenje s celicami, genska terapija in tkivno inženirstvo) - Terminološki slovarček. Ljubljana, DCTIS - Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije.
http://www.dctis.si/wp-content/uploads/2014/02/SC_slovarcek_SLO20.pdf (14. nov. 2014).
- Ryan U. S., Mortara M., Whitaker C. Methods for microcarrier culture of bovine pulmonary artery endothelial cells avoiding the use of enzymes. 1980. *Tissue Cell*, 12: 619-635
- Sart S., Schneider Y-J., Agathos S. N. 2010. Influence of culture parameters on ear mesenchymal stem cells expanded on microcarriers. *Journal of Biotechnology*, 150: 149-160
- Schöler H. R. 2007. "The Potential of Stem Cells: An Inventory". V: Nikolaus Knoepffler, Dagmar Schipanski, and Stefan Lorenz Sorgner. *Humanbiotechnology as Social Challenge: an interdisciplinary introduction to bioethics*. Knoepffler N., Schipanski D., Sorgner S. L. England, Ashgate Publishing: 28

- Schop D., Janssen F. W., Borgart E., de Bruijn J. D., van Dijkhuizen-Radersma R. 2008. Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2, 2-3: 126-135
- Schop D., van Dijkhuizen-Radersma R., Borgart E., Janssen F. W., Rozemuller H., Prins H. J. 2010. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 4: 131-40
- Stocchero I. N. and Stocchero G. F. 2011. Isolation of Stem Cells from Human Adipose Tissue: Technique, Problems and Pearls. *Adipose Stem Cells and Regenerative Medicine*, doi: 10.1007/978-3-642-20012-0_2: 6 str.
- Strober W. 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 21, 3B: A3B1-A3B2, doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21: 3 str.
- Sun L. Y., Lin S. Z., Li Y.S., Harn H. J., Chiou T. W. 2011. Functional cells cultured on microcarriers for use in regenerative medicine research. *Cell Transplant*; 20, 1: 49-62, doi: 10.3727/096368910X532792: 14 str.
- Timmins N. E., Kiel M., Günther M., Heazlewood C., Doran M. R., Brooke G., Atkinson K. 2012. Closed System Isolation and Scalable Expansion of Human Placental Mesenchymal Stem Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 109: 1817-1826, doi 10.1002/bit.24425: 10 str.
- van Wezel A. L. 1967. Growth of cell-strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture. *Nature*, 216: 64-65
- Wakitani S., Imoto K., Yamamoto T., Saito M., Murata N., Yoneda M. 2002. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*, 10: 199-206
- Yoshimura K., Shigeura T., Matsumoto D., Sato T., Takaki Y., Aiba-Kojima E., Sato K., Inoue K., Nagase T., Koshima I., Gonda K. 2006. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *Journal of Cell Physiology*, 208: 64-76
- Zhou Z., Chen Y., Zhang H., Min S., Yu B., He B. 2013. Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury. *Cytotherapy*, 15: 434-448

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Tamari Lah Turnšek za vodenje, dostopnost, hiter in natančen pregled magistrske naloge.

Somentorici asist. dr. Heleni Motaln se zahvaljujem za vso pomoč, potrpežljivost in nasvete pri izdelavi ter pregledu magistrske naloge.

Hvala recenzentu prof. dr. Primožu Rozmanu za hiter strokovni pregled magistrske naloge.

Posebno zahvalo namenjam Katji Kološa, za uvajanje v delo v celičnem laboratoriju, nasvete, predloge in pomoč tako pri eksperimentalnem delu naloge kot tudi pri oblikovanju magistrskega dela. Hvala za ves čas in dostopnost tudi v času porodniškega dopusta.

Iskrena hvala tudi družini, ki mi je omogočila študij, mi stala ob strani in verjela vame.