

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ajda MARIČ

BIOS *IN VITRO*

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ajda MARIČ

BIOS *IN VITRO*

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

BIOS *IN VITRO*

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (ZTM) RS in v podjetju Biobanka d.o.o.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija biotehnologije je bil na seji dne 16. 6. 2012, za mentorja diplomskega dela imenovan doc. dr. Miomir Knežević, univ. dipl. biol., za somentorja doc. dr. Polona Tratnik, za recenzenta izr. prof. dr. Primož Rožman, dr. med., spec. transf. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za
agronomijo

Član: doc. dr. Miomir KNEŽEVIĆ, univ. dipl. biol.
Biobanka d.o.o., Trzin

Članica: doc. dr. Polona TRATNIK
Univerza na Primorskem, Fakulteta za humanistične študije,
Oddelek za kulturne študije

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

Datum zagovora:

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

Ajda Marič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 602.9:616.594:57.085(043.2)=163.6
KG	in vitro metode/aplikacije v biotehnologiji/regenerativna medicina/zdravljenje/ bolezni las/lasje/gojenje/biometnost
AV	MARIČ Ajda
SA	KNEŽEVIĆ, Miomir (mentor), TRATNIK, Polona (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2013
IN	BIOS <i>IN VITRO</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 68 str., 4 pregl., 22 sl., 5 pril., 49 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen diplomskega dela je preveriti, ali lahko matične celice (stromalne celice) in epitelne celice, ki se nahajajo v lasnem mešičku, vplivajo na rast lasu v <i>in vitro</i> pogojih. Ker podkožno maščobno tkivo prav tako vsebuje matične celice, smo optimizirali izolacijo matičnih celic iz maščobnega tkiva za namene preučevanja podporne plasti za rast lasnega mešička ter ekstrapolacijo pridobljenega znanja na estetsko in regenerativno medicino, saj sta metoda in tehnika ključnega pomena za uporabo tako v regenerativni medicini kot estetski kirurgiji. Za ohranjanje visoke kvalitete celic, namenjenih klinični uporabi, je treba spremljati tudi lokacijo odvzema maščobnega tkiva. Pri tehničnem vidiku izolacije matičnih celic iz maščobnega tkiva je treba izbrati najprimernejši način odvzema (liposukcije), saj so določene tehnike (npr. izolacija s peristaltično pumpo) precej agresivne za celice. Slednje so zelo občutljive in moramo z njimi pazljivo ravnati. Na podlagi dognanj, ki bi jih pridobili iz širše raziskave, bi tako optimizacijo prilagodili posamezniku in s tem zagotovili največji donos v številu viabilnih celic. Sodelovali smo tudi na področju biometnosti. Na ta način smo preko umetniškega projekta Bios <i>in vitro</i> (predstavljen pod imenoma <i>Las in vitro</i> in <i>Iniciacija</i>) znanost približali širši javnosti in tako z njo komunicirali na različnih dogodkih. Komunicirali smo tudi s pomočjo dveh publikacij na temo projekta.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 602.9:616.594:57.085(043.2)=163.6
CX	<i>in vitro</i> methods/applications in biotechnology/regenerative medicine/treatment/hair growth disorders/hair/growth/bioart
AU	MARIČ Ajda
AA	KNEŽEVIĆ, Miomir (supervisor)/ TRATNIK Polona (co-supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Biotechnology Studies
PY	2013
TY	BIOS <i>IN VITRO</i>
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XI, 68 p., 4 tab., 22 fig., 5 ann., 49 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	The purpose of research is to determine if stem cells (stromal cells) and epithelium cells present in the hair bulb affect the growth of hair <i>in vitro</i>. Adipose tissue located under the skin can also be the source of stem cells. We began our project with the optimization of stem cell isolation from adipose with the intention to use them as a feeder layer for hair growth studies and extrapolation of the gained knowledge to aesthetic and regenerative medicine. Adipose stem cells are widely used in treatments in regenerative medicine and aesthetic surgery. To achieve high stem cell quality that is needed for clinical trials, it is important to know the location from where the adipose tissue is being taken from. For the successful isolation of viable adipose stem cells we need to select the appropriate method of liposuction, as certain techniques (e.g. the peristaltic pump) can be too aggressive for the sensitive cells. Based on the conclusions derived from our research, we were able to select the best isolation technique. With that optimize stem cell isolation can be based on each patient, thus allowing a higher cell yield and better cell quality and viability. We also worked in the field of bioart. With the project <i>Bios in vitro</i> (also known as <i>Hair in vitro</i> and <i>Initiation</i>) we communicated our research with the wider public on different events. We also communicated with public with the help of two project based publications.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 BARVA KOŽE	4
2.1.1 Evolucija barve kože pri človeku in izguba poraščenosti	4
2.1.2 Vloga vitamina D v evoluciji kožne barve	7
2.2 CELOSTEN VIDIK LASU OZ. DLAKE	8
2.2.1 Roženenje	8
2.2.2 Stopnja razvoja lasu oz. dlake in obarvanost	9
2.2.2.1 Stopnje razvoja lasu oz. dlake	9
2.2.2.2 Vrste dlake	10
2.2.2.3 Barva las	11
2.3 OSNOVNE ZNAČILNOSTI LASU	12
2.3.1 Morfologija lasu	12
2.3.2 Osnovne značilnosti lasu in lasni cikel	16
2.3.2.1 Morfogeneza v zarodku	17
2.3.2.2 Morfogeneza po rojstvu	18
2.3.2.3 Lasni cikel	19
2.3.2.3.1 Anagen	19

2.3.2.3.2	Katagen	22
2.3.2.3.3	Telogen	23
2.3.3	Dejavniki vpliva na rast las	25
2.3.3.1	Signalna pot WNT	25
2.3.3.2	Rastni faktorji	28
2.3.3.3	Hormonski in nevronske dejavniki	29
2.3.3.4	Vpliv matičnih celic na rast lasu	30
2.3.4	<i>In vitro</i> gojenje	31
2.3.4.1	Merjenje rasti lasu	31
2.3.4.2	Modeli za rast las v pogojih <i>in vitro</i>	31
2.4	PREDSTAVITEV PODROČJA BIOUMETNOSTI	33
3	MATERIALI IN METODE	37
3.1	MATERIALI	37
3.1.1	Preiskovanci	37
3.1.2	Laboratorijski pribor in material	37
3.2	METODE	38
3.2.1	Potek dela v laboratoriju po prejetju tkiva	38
3.2.2	Uporaba naprave BioStation IM CELL S1	39
3.2.3	Protokol za izolacijo celic iz maščobnega tkiva	40
3.2.4	Štetje celic	43
3.2.5	Prekrivanje gojilnih posodic z želatino	44
4	REZULTATI	45
4.1	IZOLACIJA LASNEGA MEŠIČKA, UPORABA NAPRAVE BIOSTATION IN OPAZOVANJE LASNEGA CIKLA	45
4.2	OPTIMIZACIJA IZOLACIJE CELIC IZ MAŠČOBE	47
4.3	REZULTATI IZOLACIJE CELIC	48
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	53
5.1	RAZPRAVA	53
5.1.1	Znanstveni del	53
5.1.1.1	Uporaba naprave BioStation	53
5.1.1.2	Potek izolacije mezenhimskim podobnih matičnih celic iz maščobe	54
5.1.2	Umetniški del	55

5.2	SKLEPI	57
6	POVZETEK	59
7	VIRI	62
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl.1: Glavni predstavniki rastnih faktorjev in njihove funkcije (Peus in Pittelkow, 1996)	28
Pregl. 2: Hormonalni in nevronske faktorji ter njihov vpliv (Paus in Cotsarelis, 1999)	29
Pregl. 3: Raztopina kolagenaze	41
Pregl. 4: Raztopina za inaktivacijo kolagenaze	41

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Prikaz plasti kože (A) in pokožnica z melanociti in langerhansovo celico med keratinociti (B) (Štiblar Martinčič, 2008: 23)	5
Sl. 2: Koža in nekateri njeni derivati (Štiblar Martinčič, 2008: 21)	9
Sl. 3: Shematski prerez lasu, ki prikazuje glavne komponente lasnega stebila (Harding in Rogers, 1999)	14
Sl. 4: Razvoj lasu in lasni cikel (Stenn in Cotsarelis, 2005:2)	18
Sl. 5: Faze rasti lasu (Randall in Botchkareva 2009: 10)	19
Sl. 6: Prikaz folikla v fazi anagen (Parakkal, 1979)	21
Sl. 7: Prikaz folikla v katagen fazi (Parakkal, 1979)	23
Sl. 8: Prikaz folikla v fazi telogen (Parakkal, 1979)	25
Sl. 9: Shematski prikaz signalnih poti Wnt, znanih leta 1996 in 2001 (Fuchs in sod. 2001: 10)	27
Sl. 10: Lasni stimulatorji in inhibitorji (Li in Clevers, 2010: 545)	27
Sl. 11: Kirurški odvzem tkiva	39
Sl. 12: BioStation (BioStaiton IM-Q, 2012)	40
Sl. 13: Ločitev vzorca po centrifugiranju	41
Sl. 14: Vzorec po zadnjem centrifugiranju	42
Sl. 15: Prikaz postopka od prejetja tkiva do izolacije lasnega mešička in pregled vzorca pod mikroskopom	45
Sl. 16: Dogajanje v napravi BioStation	46
Sl. 17: Sveže izolirane (A) celice iz maščobnega tkiva in razrast mezenhimskih celic po gojenju (B)	47
Sl. 18: Število izoliranih celic na 1 ml maščobe glede na tehniko liposukcije	49
Sl. 19: Število celic na 1 ml maščobe	50
Sl. 20: Viabilnost (%) izoliranih celic iz maščobe	51
Sl. 21: Viabilnost (%) izoliranih celic glede na metodo liposukcije	51
Sl. 22: Število viabilnih celic glede na metodo liposukcije	52

KAZALO PRILOG

Priloga A: Dokumentacija za etično komisijo RS

Priloga B: Odmevnost projekta *Bios in vitro* oz. *Las in vitro* ter *Iniciacija*

Priloga C: Prikaz podatkov, ki so pridobljeni po izolaciji celic iz maščobe

Priloga D: Publikaciji in video material v sklopu projektov *Bios in vitro* in *Iniciacija*

Priloga E (CD): Predstavitveni filmi v sklopu projekta in znanstveni monografiji

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ASC	adipozne matične celice (ang. adipose derived stem cells)
BMP4	kostni morfogenetski protein 4 (ang. bone morphogenetic protein 4)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
Dsh protein	Dsh protein (ang. dishevelled protein)
EGF	epidermalni rastni dejavnik (ang. epidermal growth factor)
FZB	frizzled-related (ang. frizzled-related protein)
FGF	fibroblastni rastni dejavnik (ang. fibroblast growth factor)
GSK-3	glikogen sintezna kinaza 3 (ang. glycogen synthase kinase 3)
HGF	hepatocitni rastni dejavnik (ang. hepatocyte growth factor)
Hox13	homeobox 13 (ang. homeobox transcription factor)
IGF	inzulinu podoben rastni dejavnik (ang. insulin-like growth factor)
Lef-1	vezni faktor 1 limfnega ojačevalca (ang. lymphoid enhancer binding factor 1)
LRP5/6	nizko-gostotni lipoproteinski receptor- podobni protein 5/6 (ang. low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6)
Msx1	segmenti mišičnih proteinov (ang. muscle segment homeobox)
MSC	mezenhimske matične celice (ang. mesenchymal stem cells)
MSH	melanocitni-stimulirajoči hormon (ang. melanocyte-stimulating hormone)
mc1r	receptor melanokortin-1
NGF	možganski nevrotrofni dejavnik (ang. nerve growth factor)
Shh	Sonic hedgehog homologni proteini (ang. Sonic hedgehog homolog)
TCF	T-celični transkripcijski dejavnik (ang. T-cell factor)
TGF-β	transformacijski rastni faktor β
UV	ultravijolično
VEGF	rastni dejavnik žilnega endotelija (ang. vascular endothelial growth factor)
WNT	družina proteinov Wnt

1 UVOD

Albert Einstein pravi, da je najlepše, kar lahko doživimo, še neznano. To je vir prave umetnosti in znanosti. S temi besedami bi lahko opisala področje diplomske naloge. Delovali smo na področju znanosti in umetnosti ter odkrivali (za nas) neznano.

Osredotočili smo se na optimizacijo izolacije matičnih celic iz maščobe in na njihovo uporabo v »rdeči« oz. medicinski biotehnologiji za potrebe vzgajanja lasnih mešičkov v pogojih *in vitro*. Naša dognanja se bodo prenesla na tehnološke rešitve na področju uporabnosti matičnih celic v medicini.

Umetniška želja po vizualizaciji nas je vodila od kirurške operacije, do osamitve lasu, tretiranja lasu v pogojih *in vitro* in vizualne predstavitve lasu, ki smo jo pripravili s pomočjo aparature BioStation.

Želja po doseganju neznanega nas je gnala še naprej in iz nje se je razvila nadgradnja umetniškega projekta Bios *in vitro*, imenovana *Iniciacija*.

Projekt je sestavljen iz treh dopolnjujočih se delov, in sicer tehnološkega, humanističnega ter umetniškega dela. Namen projekta je predstaviti znanstvenobiološki projekt širši javnosti na popolnoma nov, izviren način, saj menimo, da je pri nas kot tudi drugod po svetu tehnološka izvedba mnogokrat skrita pred očmi javnosti.

Veja v sodobni umetnosti, ki se imenuje bioumetnost, se je razvila v 80. letih prejšnjega stoletja, ko je Vilem Flusser napisal serijo esejev o odkritju v znanosti, v katerih je obravnaval življenje, genetsko informacijo, ustvarjanje novih form, evolucijo ipd. S temi spisi je Flusser uvedel biotehnološki diskurz v svet umetnosti in predlagal, da se umetnost neposredno loti manipuliranja z živim materialom (Tratnik, 2010).

1.1 NAMEN DELA

Znano je, da se vsak deseti človek sooča z večjo izgubo las. Obstajajo razlike v vzrokih in oblikah izpadanja. Določena zdravila lahko prehodno razredčijo lase, kot na primer ščitnični hormoni, zdravila za nižanje holesterola, zdravila za redčenje krvi, zdravila proti raku. Vzroki izpadanja so lahko tudi infekcijske bolezni, hormonske spremembe (nosečnost, dojenje) ali pomanjkanje določenih hranilnih snovi, kot sta železo in cink (Lanbein in Skalnik, 2007).

Namen dela je preveriti, ali lahko matične celice (stromalne celice) in epitelne celice, ki se nahajajo v lasnem mešičku, vplivajo na rast lasu *in vitro*. V nadaljevanju smo proučevali tudi maščobno tkivo – podkožno tkivo, ki vsebuje matične celice, ki verjetno služijo kot hranilna plast lasnim mešičkom in z medsebojno komunikacijo pripomorejo k daljšanju lasu. Populacije celic, izolirane iz maščobnega tkiva ali iz lasnega mešička, so podobne mezenhimskim matičnim celicam iz kostnega mozga, te pa so se že izkazale kot primerna hranilna plast različnim tipom celic (megakariocitom, embrionalnim matičnim celicam).

Zaradi potreb v estetski kirurgiji, ki se nanašajo na pridobivanje kakovostnih matičnih celic iz čim manjših volumnov vzorcev, smo se lotili priprave kar najboljšega postopka za izolacijo matičnih celic iz maščobnega tkiva. Izbrali smo najustreznejšo tehniko liposukcije in nato izolacije celic v laboratoriju. Naš cilj je bil pripraviti metode s katerimi bomo lahko kar najboljše izkoristili maščobo, ki se drži lasnega tkiva. S tem bomo lahko v prihodnosti za izolacijo matičnih celic uporabili tudi maščobno tkivo po operaciji lasišča ali predela, kjer se nahajajo dlake.

V sklopu diplomske naloge smo optimizirali izolacijo matičnih celic iz maščobe za preučevanje podporne plasti za rast lasnega mešička in znanje ekstrapolirali na estetsko ter regenerativno medicino, saj sta metoda in tehnika ključnega pomena za uporabo tako v regenerativni medicini kot estetski kirurgiji.

Sodelovali smo tudi na področju bioumetnosti, saj želimo na ta način preko umetniškega projekta Bios *in vitro* (predstavljen pod imenoma *Las in vitro* in *Iniciacija*) znanost približati širši javnosti in tako z njo komunicirati.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Matične celice iz lasnega mešička vplivajo na rast lasu *in vitro*, pri tem pa jim pomagajo tudi matične celice iz maščobnega tkiva.

Las je možno gojiti v pogojih *in vitro* dalj časa.

Za boljši izkoristek potenciala matičnih celic je potrebna optimizacija protokola za osamitev oz. izolacijo matičnih celic.

2 PREGLED OBJAV

Za razumevanje tematike diplomske naloge je treba poznati pomen in vlogo dlake med evolucijskim razvojem človeka (povezani obrambni mehanizmi na vplive iz okolja). Evolucijski pritisk na izgubo poraščenosti hominidov (človečnjakov) je privedel do obarvanosti kože. Razumevanje razvoja/funkcije dlake oz. lasu se tako nanaša na sam začetek pojava dlake oz. poraščenosti in njen funkcijski pomen.

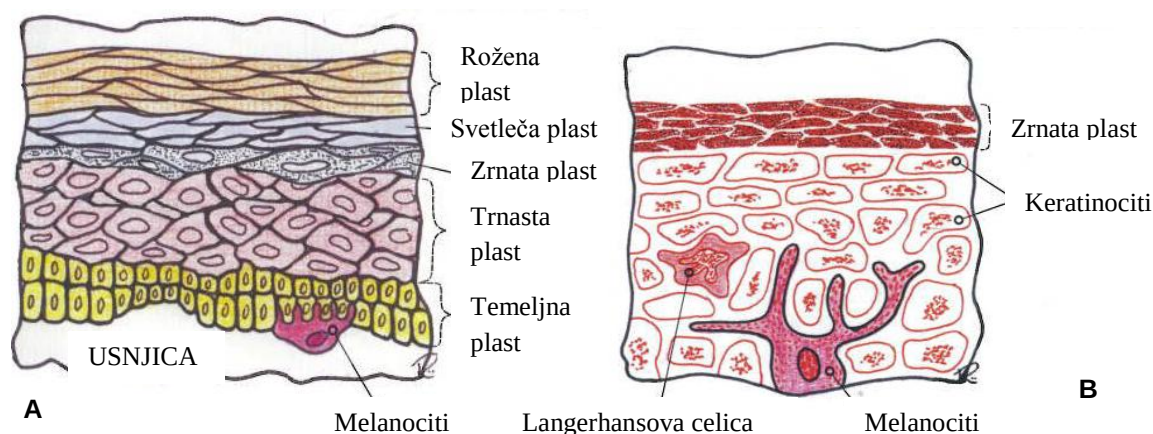
2.1 BARVA KOŽE

2.1.1 Evolucija barve kože pri človeku in izguba poraščenosti

Barva kože je odvisna od količine rjavega pigmenta melanina, rumenega pigmenta karotena in barve krvi, ki proseva iz krvnih žil, oz. od količine kisika, vezanega na hemoglobin v eritrocitih (Štiblar Martinčič, 2008).

Pigment melanin tvorijo pigmentne celice, imenovane melanociti, ki ležijo v temeljni plasti pokožnice (Štiblar Martinčič, 2008). Melanin deluje kot filter za UV-žarke in ščiti kožo pred opeklinami (Anatomski ..., 2004). Iz bazalne plasti se dvigne v višjo plast, ko se bazalne celice delijo in migrirajo v roženo plast (*stratum corneum*) ter na ta način zaščitijo vse plasti kože kot tudi krvne žilice pred sončnimi poškodbami (Juzeniene in sod., 2009). Količina melanina je v različnih predelih kože in tudi drugih organih različna (Štiblar Martinčič, 2008). Visoke količine melanina najdemo v določenih delih kože, kot so sončne pege, materina znamenja, prsne bradavice, prsni kolobar. Manjše količine zasledimo v ustnicah, na delih zunanjih splovil, dlaneh, podplatih in na spodnji strani prstov na rokah ter nogah (Seeley in sod., 1995). Ljudje temne polti imajo večjo količino melanina, ljudje svetle polti pa manjšo. Nastajanje melanina tudi razloži razlike v obarvanosti kože glede na letne čase (Anatomski ..., 2004). Sam proces nastajanja melanina imenujemo melanogeneza (Zorc, 2012). Poleti porjavimo, ker smo dalj časa izpostavljeni sončnim žarkom (Anatomski ..., 2004), zato se nastajanje melanina pospeši do take mere, da zavaruje belo kožo (Človeško ..., 1985). Melanin v

keratinocitih v obliki kapice pokrije zgornji pol jedra in tako zaščiti DNA pred škodljivim učinkom UV-sevanja (Zorc, 2012). S tem prepreči prodor žarkov globlje v plasti kože. Melanocit je celica z močno razvejano citoplazmo, ki vsebuje celične organele za tvorbo pigmenta. Melanociti ne tvorijo keratina in vsebujejo visokospecifične fenotipične organele – z membrano obdane melanosome z melaninom, ki je končni produkt sintetske aktivnosti melanocitov (Zorc, 2012). Zrela zrnca melanina prestopijo v citoplazmo keratinocitov, kjer ležijo ob jedru in ga varujejo pred sončnim UV-sevanjem (Štiblar Martinčič, 2008).



Slika 1: Prikaz plasti kože (A) in pokoznica z melanociti in langerhansovo celico med keratinociti (B) (Štiblar Martinčič, 2008: 23)

Najstarejši primerki hominidov (človečnjakov) so najverjetneje imeli nepigmentirano ali rahlo pigmentirano povrhnjico, prekrito s črno dlako. Pigmentacija in izguba dlake sta se začeli že zelo kmalu v evoluciji rodu *Homo* (pred 1,5 do 2 milijoni let). Temnejši epidermis je zaščitil žleze znojnice pred poškodbami, povzročenimi s strani UV-radiacije, na tak način se je zaščitila celotna telesna termoregulacija. Z vidika evolucije in uspeha vrste je smisel pigmentacije v tem, da nas melanizirana koža zaščiti pred UV-inducirano fotolizo folata, metabolita, ki je esencialen za normalen embrionalni razvoj nevralne cevi oz. hrbtenjače in spermatogenezo. Folati spadajo med vitamine B in so bistveni za ohranjanje normalne DNA (Jablonski in Chaplin, 2000; Wheeler, 1996). Ko so se hominidi začeli seliti iz tropskega okolja, se je razvila depigmentacija, ki je omogočila UV-inducirano sintezo vitamina D (Yuen in Jablonski, 2010).

Barva kože je prilagodljiva in labilna, saj se je med evolucijo večkrat spremenila. Zato barva kože ni primerna za določevanje filogenetskih povezav med modernimi človeškimi skupinami. Jablonski in Chaplin (2000) sta v študiji *The evolution of human skin coloration* ugotovila naslednje:

- Odbojnost kože je močno povezana z absolutno geografsko širino in stopnjo UV-sevanja. Najvišjo korelacijo med odbojnostjo kože in stopnjo UV-sevanja so opazovali pri valovni dolžini 545 nm, tj. v bližini maksimalne absorpcije oksihemoglobina. Iz tega je razvidno, da je glavna vloga melanina pri človeku zaščita pred poškodbami, ki jih povzroča UV sevanje, na vsebino krvnih žil, lociranih v dermisu.
- Majhno odstopanje izmerjenih vrednosti predvidene odbojnosti kože iz podatkov, ki so na voljo v podatkovnih bazah in literaturi.
- Ženske so svetlejše polti kot moški zaradi velike potrebe po vitaminu D₃ v času nosečnosti in laktacije za normalen razvoj otroka. Ključnega pomena je transformacija iz provitamina D₃ v vitamin D₃ z vmesnimi transformacijami [izpostavljenost soncu povzroči, da se 7-dehidroholesterol v koži spremeni v provitamin D₃. Pod vplivom UV-sevanja pride do izomeracije, s tem pa do nastanka vitamina D₃].
- Pigmentacija kože znotraj avtohtonih prebivalcev je v korelaciji z UV-sevanjem in predstavlja kompromisno rešitev med navzkrižji fizioloških potreb po fotoprotekciji in sintezo vitamina D (Jablonski in Chaplin, 2000; Wheeler, 1996).

Juzeniene in sod. (2009) so obravnavali več hipotez, in sicer v povezavi s temnejšo kožo: zaščita žlez znojnic in kožne vaskulature, zaščita kože pred rakom, zaščita pred preveliko produkcijo vitamina D, prikrivanje, obramba pred mikroorganizmi, zaščita folatov v krvi. V povezavi s svetlejšo kožo so obravnavali hipoteze, ki se nanašajo na

spolno selekcijo in spolni dimorfizem, adaptacijo na hladnejše okolje, vitamin D in genetski zdrs. V svojem članku so obravnavali tudi genetski vidik barve kože, poljedelstvo in povezavo z vitaminom D ter efekt vitamina D na zdravje. V svoji raziskavi so prišli do spoznanja, da je do spremembe barve kože prišlo zaradi adaptacije na sončno UV-radiacijo (zaščita žlez znojnic, zaščita pred sončnimi opeklinami, kožnim rakom, pomanjkanje vitamina D, obramba proti mikroorganizmom itd.) in/ali spolne selekcije. Migracije v območja z višjo UV-radiacijo so vodile do temnejše kožne barve, medtem ko so migracije v območja z nižjo UV-radiacijo vodila do svetlejšje kožne barve.

Kljub temu ne smemo zanemariti ostalih faktorjev, ki so imeli določeno vlogo. Temperatura in hrana sta bili verjetno sekundarni determinanti (Juzeniene in sod., 2009).

Smiselno je izpostaviti tudi dognanje, ki ga opisuje Barsh (2003), ki pravi, da imajo vsi tipi barve kože enako število melanocitov, vendar so število, velikost, agregacija in distribucija melanosomov znotraj keratinocitov različni. Melanosomi in keratinociti temnejše kože so večji, bolj pigmentirani in distribuirani individualno/posamezno. Koža t. i. Kavkazov (ljudi, ki izhajajo iz Evrope, S Afrike, Z Azije, J Azije in predelov centralne Azije) vsebuje manjše keratinocite, ki vsebujejo manj melanina in so distribuirani v skupinah. Temnejša koža vsebuje več melanosomov.

2.1.2 Vloga vitamina D v evoluciji kožne barve

Obstajata dve hipotezi, ki pojasnjujeta vzrok variabilnosti barve kože: ena bazira na naravni selekciji, druga pa na seksualni oz. reproduktivni selekciji, ki je omogočila obstoj vrste (Yuen in Jablonski, 2010).

Hipoteza, ki govori o posvetlitvi kože, se sklicuje na optimizacijo proizvodnje vitamina D. Nekateri raziskovalci na tem področju trdijo, da je imelo pomanjkanje vitamina D, ki vodi do številnih obolenj (rahitisa, osteomalacije (mehčanja kosti) in poškodb oz. povečanja nezmožnosti reprodukcije), vlogo selekcijskega pritiska. Študije na živalih in

klinična opazovanja so ovrednotila vpliv vitamina D na plodnost. Njegovo pomanjkanje lahko privede do vrste različnih kliničnih obolenj, ki škodujejo zdravju in povečajo stopnjo umrljivosti. Poveča se dovzetnost za bakterijske in virusne okužbe, za rahitis in osteomalacijo ter osteoporozo, možnost za obolenje za rakom, visok krvni tlak, bolezni srca in ožilja, v zrelejši dobi človeka lahko vodi v diabetes, avtoimunske bolezni, kot so multipla skleroza, revmatoidni artritis, vnetne črevesne bolezni, diabetes tipa 1 in bolezni dlesni (Yuen in Jablonski, 2010). Yuen in Jablonski (2010) v svoji študiji trdita, da se je svetlejša barva kože na višjih zemljepisnih širinah razvila zaradi lažje proizvodnje vitamina D v razmerah z nizko radiacijo UV-B, da bi preprečila številne bolezni v povezavi z reproduktivnostjo in zgodnjo umrljivostjo.

2.2 CELOSTEN VIDIK LASU OZ. DLAKE

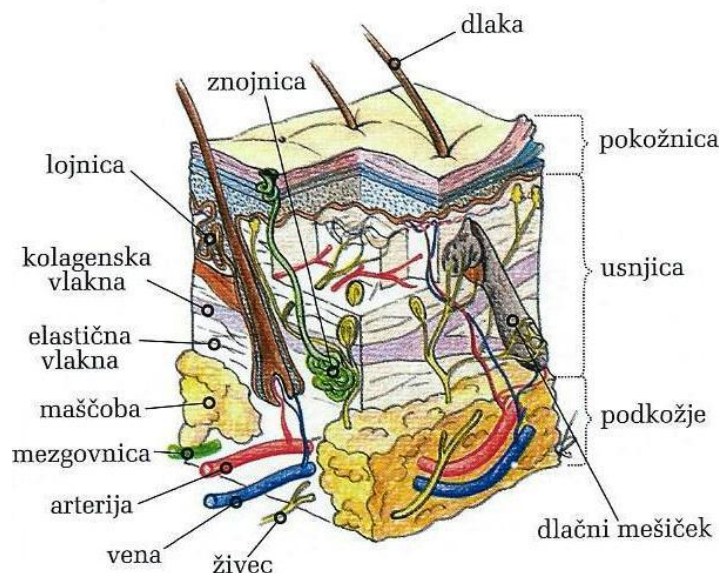
2.2.1 Roženenje

Roženenje ali keratinizacija je dinamičen proces z biokemičnimi ali morfološkimi spremembami v celicah. Je posledica aktivnosti epiteljskih celic, pri kateri se tvorijo rožene strukture, kot so rožena plast kože, lasje, dlake in nohti. V koži poteka roženenje od temeljne plasti, ki je skupaj s trnasto odgovorna za obnovo celic podkožnice, do rožene plasti z mrtvimi celicami, podobnimi roženim luskam (Štiblar Martinčič, 2008).

Rožene tvorbe – lasje, nohti in rožena plast pokožnice – nastanejo zaradi aktivnosti epiteljskih celic (Štiblar Martinčič, 2008).

Lasje in dlake imajo enako zgradbo. Las kot rožena tvorba leži v lasnem mešičku, ki je pod kožo. Del lasu pod kožo imenujemo korenina, nad kožo je steblo. Las je zgrajen iz več plasti: sredica je osrednji del, ki ga obkroža skorja. Sledita notranja in zunanja lasna ovojnica, ki ju v koreninskem delu obdaja vezivni tulec. Ob laseh in dlakah je gladka mišična ježilka. V lasni mešiček se izlivajo žleze lojnice. Lasje in dlake imajo predvsem zaščitno nalogo. Lasje predstavljajo izolacijo pred mrazom in sončnimi žarki ter ščitijo

pred udarci. Obrvi in trepalnice ščitijo zrklo. Prav tako služijo zaščitni dlake na vhodu v nosno votlino, uho, zadnjično odprtino in nožnico (Štiblar Martinčič, 2008).



Slika 2: Koža in nekateri njeni derivati (Štiblar Martinčič, 2008: 21)

2.2.2 Stopnja razvoja lasu oz. dlake in obarvanost

2.2.2.1 Stopnje razvoja lasu oz. dlake

Lasje (dlake) se pri zarodku pojavijo v devetem embrionalnem tednu. Iz bazalnih celic epidermisa se razvije matriks, iz veziva papila, pridružujejo se še lojnice in mišica naježevalka (errector pili). Po rojstvu ni več neogeneze lasnih foliklov. Fetalni lanugo zamenjajo po rojstvu brezbarvni velusni lasje (dlake), kasneje pa terminalni lasje (dlake). Število lasnih (dlačnih) foliklov in njihova aktivnost sta dedno določena, nanje pa delujejo tudi hormonski vplivi. Zlasti pomembno je delovanje androgenih hormonov (Kocjančič, 1993).

2.2.2.2 Vrste dlake

Človeško telo pokrivajo različne vrste dlak.

LANUGO DLAKE se pojavijo okoli 5. ali 6. meseca fetalnega razvoja in predstavljajo prve dlake, ki nastanejo po razvoju foliklov in enakomerno pokrivajo celotno telo. Navadno obstajajo le v času intrauterinega življenja oz. odpadejo med 7. in 8. mesecem embrionalnega življenja. Lanugo dlake so tanke, relativno dolge, mehke, brez medule in običajno nepigmentirane (Rook, 1965; Seeley in sod., 1995; Godić, 2009).

VELUSNE DLAKE nadomestijo lanugo dlake skoraj na vseh delih telesa, razen na dlaneh, podplatih, ustnicah, spodnjih površinah prstov in na mestih, kjer se razvijejo terminalne dlake. Velusne dlake so tanke, do 2 cm dolge dlake postnatalnega življenja brez medule in so hipopigmentirane ali nepigmentirane (Rook, 1965; Seeley in sod., 1995; Godić, 2009). Pri moških obrazne velusne dlake zamenjajo terminalne dlake, ki oblikujejo brado (Seeley in sod., 1995).

TERMINALNE DLAKE delimo na primarne in sekundarne. Primarne zamenjajo lanugo dlake na predelu lasišča, obrvi in trepalnic, preden pride do poroda. Te so grobe, pigmentirane, relativno dolge in vsebujejo medulo. Sekundarne terminalne dlake se razvijejo v puberteti kot odgovor na androgene hormone (Rook, 1965; Seeley in sod., 1995; Godić, 2009). Pri moških terminalne dlake predstavljajo 90 % pokritost po telesu na predelih prsnega koša, nog, rok in dlak pod pazduho. Pri ženskah terminalne dlake predstavljajo 35 % pokritosti po telesu (Seeley in sod., 1995).

INTERMEDIATNE DLAKE so vmesni tipi dlak med velusnimi in terminalnimi dlakami (Godić, 2009). V nekaterih foliklih je ta prehod nenaden, na primer na glavi pred rojstvom ali v predelu sramničnih dlak v času pubertete. V drugih foliklih nastane več generacij intermediatnih dlak, od tega je vsaka naslednja rahlo bolj groba od prejšnje, dokler se ne razvijejo terminalne dlake (Rook, 1965).

2.2.2.3 Barva las

Zasnova za barvo las in kože je zapisana v naših genih. Pigment, ki je odgovoren za barvo, se imenuje melanin (Griffiths in sod., 2008). Melanin je organski polimer iz derivatov oksidacije tirozina (Barsh, 2003). Delimo ga na dva tipa: feomelanin (odtenki rdeče in rumene), ki je bogat s cisteinom, ter manj topljiv evmelanin (odtenki rjave in črne) (Griffiths in sod., 2008; Barsh, 2003). Barvni odtenek ni odvisen le od vrste melanina, temveč tudi od števila, oblike, velikosti in razporeditve pigmentnih zrn (Zviak in Dawber, 1986). Izjema so rdeči lasje, kjer melanin vsebuje železo (Seeley in sod., 1995).

Nastajanje melanina se s starostjo zmanjšuje. V steblo lasu prodirajo mehurčki zraka, kar mu daje sivo ali belo barvo (Človeško ..., 1985).

Celotna (bio)kemija melanina se odvija v kožnih celicah, imenovanih melanociti. Melanin se sintetizira po večstopenjskih biosinteznih poteh, pri katerih igrajo encimi vlogo katalizatorjev. Feomelanin je normalni produkt končane biosintezne poti, ki je odgovoren za svetli ton las. Kljub temu ima večinska populacija temnejše lase. Pri tej populaciji pride do transformacije iz feomelanina v evmelanin. Pri tem preobratu sodeluje pomemben proteinski hormon, ki se imenuje melanocitni-stimulirajoči hormon (MSH), ki je kodiran z genom, ki se izraža v hipofizi. MSH se v membranah melanocitov veže na receptor, imenovan melanokortin-1 (mclr), kar povzroči kaskado dogodkov in se odraža kot produkcija evmelanina. Prisotnost alela mclr je v naši populaciji pogosta, a vendar samo aktivnost točno določenega alela privede do temnejše barve lasu. Rezultat ostalih alelov so variacije feomelanina (rdeči, rjavi, svetli lasje) (Griffiths in sod., 2008).

2.3 OSNOVNE ZNAČILNOSTI LASU

2.3.1 Morfologija lasu

Lasje nastajajo v plasti kože usnjici in rastejo z delitvijo hitro rastočih celic iz lasnih foliklov, ki so sestavljeni iz zunanje in notranje plasti. Zunanja plast predstavlja tkivo, ki je preprejeno z žilicami in živci. Notranjo plast predstavljata zunanji in notranji ovoj. Zunanji ovoj tvori steno lasnega mešička ali folikla. S tem poimenujemo drobno jamico cevaste oblike, iz katere raste las. Na dnu mešička je las poraščen in odebeljen v lasno čebulico. Ta je sestavljena iz celic, ki z delitvijo tvorijo las, ki se nadaljuje v lasno čebulico, ki tvori matriks. V spodnjem delu lasnega mešička se vezivno tkivo čepasto razrašča v tkivo pokožnice in tako tvori lasno brbončico ali papilo, v kateri so krvne žilice, ki izločajo hranilne snovi. Tkivo pokožnice, ki obkroža lasno papilo, lahko primerjamo z zarodno plastjo pokožnice s sposobnostjo delitve. Imenujemo jo lasni matriks, njegove celice, ki se lahko delijo, pa keratinociti. Lasna brbončica je pomemben sestavni del mešička, ki s proliferajočimi celicami lasu nadzira rast in stanje lasu (Hagman, 1998; Huster in sod., 1998).

Anatomsko se las razdeli na lasno korenino, lasno steblo in lasni vrh. Lasna korenina se nahaja v koži in jo obkroža lasna ovojnica, s katero tvori lasno čebulico. Lasno steblo je vidni del lasu, ki je nad površino in je zgrajen iz lasnega stržena (medule), lasne skorje (korteksa) in lasne povrhnjice (kutikule) (Majdič, 2004). Tvorba stebila se prične z intenzivno proliferacijo in diferenciacijo matičnih celic v lasni čebulici. Celice lasne čebulice se pomikajo proti površini. Med te celice se vrivajo melanociti (Godić, 2009). Lasni vrh je različnih oblik, lahko je naravno koničast, strižen, obrabljen, razcepljen itd. (Majdič, 2004).

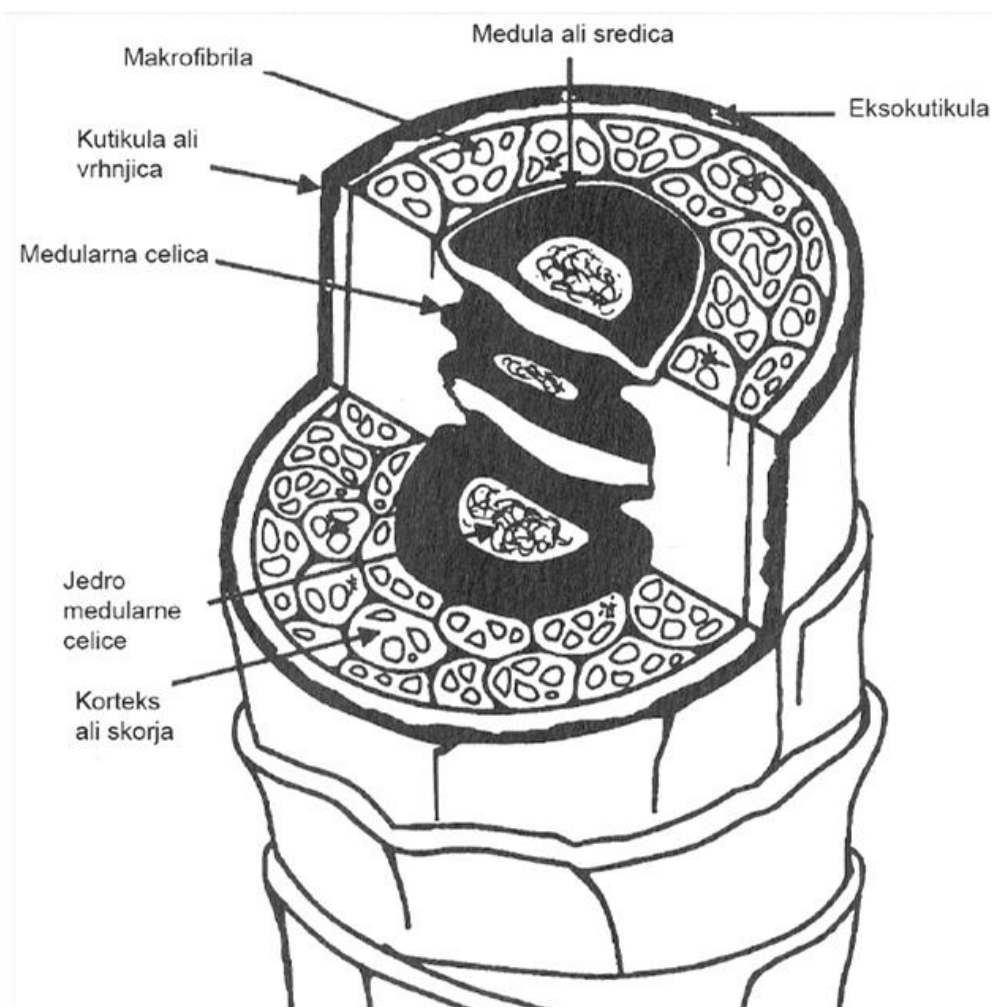
Dermalna papila ali brbončica je sestavljena iz skupine celic fibroblasta, ki se vihajajo v epitelni del lasnega folikla. To je edini dermalni oz. kožni element v foliklu in je odgovoren za nadzor lasnega cikla. Velikost nastalega lasu je direktno povezana z velikostjo papile. Če dermalno papilo odstranimo, preprečimo nadaljnjo rast. Med samim ciklom ni večjih sprememb v morfologiji papile (Zviak in Dawber, 1986).

Razvojno so melanocyte celice, ki izvirajo iz celic nevralnega grebena. V povrhnjici tvorijo povezave s keratinociti preko njihovih dendritov. Glavna funkcija teh celic v koži je pigmentacija, saj imajo sposobnost pridobivanja melanina. Sama pigmentacija lasu je rezultat tvorjenja pigmentnih zrn, ki se oblikujejo tudi v lasni čebulici (Zorc, 2012).

Lasna korenina je proliferativni del lasnega folikla. Dva do trije sloji bazalnih celic predstavljajo papilo, te celice so predhodniki vseh celic, ki se premikajo proti površini. Del lasu, ki je nad površino pokožnice, imenujemo lasno steblo, ta predstavlja le eno tretjino celic, ki se diferencirajo iz lasne čebulice. Znotraj lasne čebulice se nahaja tudi melanocitna populacija – to so dendritne celice, ki prispevajo pigment. V spodnji čebulici so matične celice enotne oblike, celice v zgornji čebulici pa začnejo z diferenciacijo v šest koncentričnih cilindrov – notranji trije predstavljajo »bodoči« las, zunanji trije pa intrinzične sloje notranje koreninske plasti (Zviak in Dawber, 1986; Hagman, 1998).

Lasni ovojnici sta odgovorni za prehranjevanje nastajajočega lasu, hitrost gibanja celic proti površini in dokončno obliko lasu. Zunanja koreninska ovojnica je nadaljevanje površinskega epidermisa in obdaja lasni mešiček po celi dolžini, ne obdaja pa spodnje čebulice. Notranja lasna ovojnica leži pod zunanjo in je zgrajena iz treh plasti. Od znotraj navzven si sledijo: kutikula notranje lasne ovojnice, ki leži nad kutikulo lasnega stebela, Huxleyjeva in Henlejeva plast (Godić, 2009).

Las je grajen koncentrično. Od sredine lasu proti zunanosti si sledijo medula, korteks, lasna kutikula, notranja lasna ovojnica in zunanja lasna ovojnica. Lasno steblo sestavljajo luskasta plast, vlaknasta plast in sredica (Godić, 2009). Nastanek teh treh plasti pogojujejo genetski dejavniki v keratinocitih, stopnje mehanskega preoblikovanja in pritiska novonastalih celic, ki pomikajo mehko celično snov navzgor. Plasti nastajajo v preoblikovalni coni, ki se nahaja v lasnem foliklu (Huster in sod., 1998).



Slika 3: Shematski prerez lasu, ki prikazuje glavne komponente lasnega stebra (Harding in Rogers, 1999)

KUTIKULA ali zunanja luskasta plast tvori zunanjo, najtanjšo plast lasnega stebra (Syred, 1991) in je epidermalnega izvora. Celice kutikule so urejene v šestih do desetih plasteh (Godić, 2009). Te celice so brez barvila (Hagman, 1998). Kutikula skupaj z notranjim koreninskim ovojem omogoča trdnost in zasidranost las v lasišču. Sestoji iz mrežasto postavljenih, druga na drugi ležečih celic, ki so med seboj povezane s proteinskim in lipidnim vezivom. Prva naloga kutikule je zaščita lasu pred zunanjimi vplivi (Huster in sod. 1998). Če je las močno poškodovan, se debelina prekrivajočega sloja celic zmanjša do točke, ko kutikule ni več in je korteks odkrit (ni zaščiten). V tem primeru lahko korteks razpade. Ločimo tri sloje kutikule, in sicer: notranjo stran (endokutikula), zunanjo stran (eksokutikula) in A-sloj (na zunanjem robu eksokutikule) (Harding in Rogers, 1999; cit. po Karničar, 2007).

KORTEKS ali skorja tvori osrednji del lasu in daje stebelu mehanske lastnosti. Tvori jo ga vretenaste celice, ki potekajo vzporedno z vzdolžno osjo lasnega stebela (Godić, 2009). Celice so med seboj močno prepletene z membranskimi proteini, kar jim daje trdnost in obliko, poleg tega pa določa tudi gladek ali nakodran videz lasu. To plast po velikosti sestavljajo protofibrili, keratinski mikrofibrili in makrofibrili. To je najpomembnejša plast lasu in predstavlja kar 80 % njegovega volumna, s prisotnostjo pigmentnih delcev pa daje lasem tudi barvo (Huster in sod., 1998). Premer korteksa je odvisen od števila celic v lasni čebulici, ki so sposobne mitoze, in hitrosti njihove celične delitve (Zviak in Dawber, 1986). Celice v spodnjem delu mešička producirajo α -keratinske fibrile. Keratinizacija je proti zgornjem delu mešička popolnejša. Stabilne disulfidne vezi in mikrofibrili se združujejo v makrofibrile. Fibrilarne proteine obdajajo matriksni proteini (Godić, 2009).

Organizacija keratiniziranih celic in biokemijska sestava omogočata lasem odpornost proti uničujočim silam, kot so trenje, vlečenje, upogibanje in UV (Zviak in Dawber, 1986).

MEDULA je notranja plast, ki nastane v preoblikovalnem delu lasnega mešička (Huster in sod., 1998). Sestavljena je iz medularnih celic, ki vsebujejo zračne mehurje in zrna maščobe. Pri mnogih živalih zavzema medula več kot 50 % premera lasnega stebela in ima pomembno termoregulacijsko vlogo. Pri človeku pa se pogosto pojavlja v presledkih vzdolž lasnega stebela ali povsem manjka, verjetno ker nima več tako pomembne vloge. Medula ni prisotna v vseh človeških laseh. Lahko je kontinuirana ali diskontinuirana, kar se lahko zgodi iz dveh razlogov: je fragmentirana ali je prekinjena. Njena morfologija se močno razlikuje glede na morfologijo ostalih lasnih komponent. Značilni so številni večji medcelični in znotrajcelični prostori, proteinski material v celicah je amorfen in nestrukturiran (Zviak in Dawber, 1986; Harding in Rogers, 1999; cit. po Karničar, 2007).

2.3.2 Osnovne značilnosti lasu in lasni cikel

Las je sestavljen iz lasnega stebila, ki raste iz lasnega korena, usidranega v lasnem mešičku v koži lasišča. Las nastaja z relativno hitro delitvijo proliferativnih celic v lasnem mešičku, ki je dobro prekrvavljen in oskrbovan s hranili oz. gradbenimi elementi, potrebnimi za rast. Novo nastajajoče celice se kmalu, že v lasnem mešičku, diferencirajo oz. preoblikujejo, keratinizirajo in pigmentirajo ter tvorijo mrtvo lasno steblo. Lasno steblo vsebuje vodo, lipide, minerale in pigment melanin (Majdič, 2004). Glavna sestava lasu (dlake) je skleroprotein keratin, ki ima nasprotno od keratina v stratum korneum epidermisa zelo veliko cisteina (20 %) (Kocjančič, 1993).

Lasje ne rastejo neprekinjeno celo življenje tako kot nohti, ampak ima vsak folikel svoj dedno določen cikel, ki ni usklajen z drugimi folikli. V lasnem ciklusu ločimo tri obdobja:

- anageno obdobje rasti (traja 3 do 6 let, las zraste 0,35 mm na dan),
- katageno prehodno obdobje (traja le nekaj dni, las preneha rasti in se morfološko spremeni),
- telogeno obdobje mirovanja, ko se las počasi pomika navzven in končno po treh do štirih mesecih izpade. V tem času v foliklu že nastaja nov las (Kocjančič, 1993).

Las, ki je v telogenem obdobju, izpulimo brez bolečin. To so lasje, ki izpadajo ob vsakodnevem česanju (Kocjančič, 1993).

Trajanje posameznih obdobj lasnega ciklusa in funkcionalno stanje lasišča odsevata v razmerju med anagenimi, telogenimi in katagenimi folikli oz. lasmi. To razmerje lahko ugotovimo, če naredimo trihogram. Trihogram je preiskava epiliranih las v mikroskopu z 10- do 30-kratno povečavo. Na človeškem lasišču je večina las v anagenem obdobju, 4—24 % las je v telogenem obdobju in približno 1 % las v katagenem obdobju. Če je na

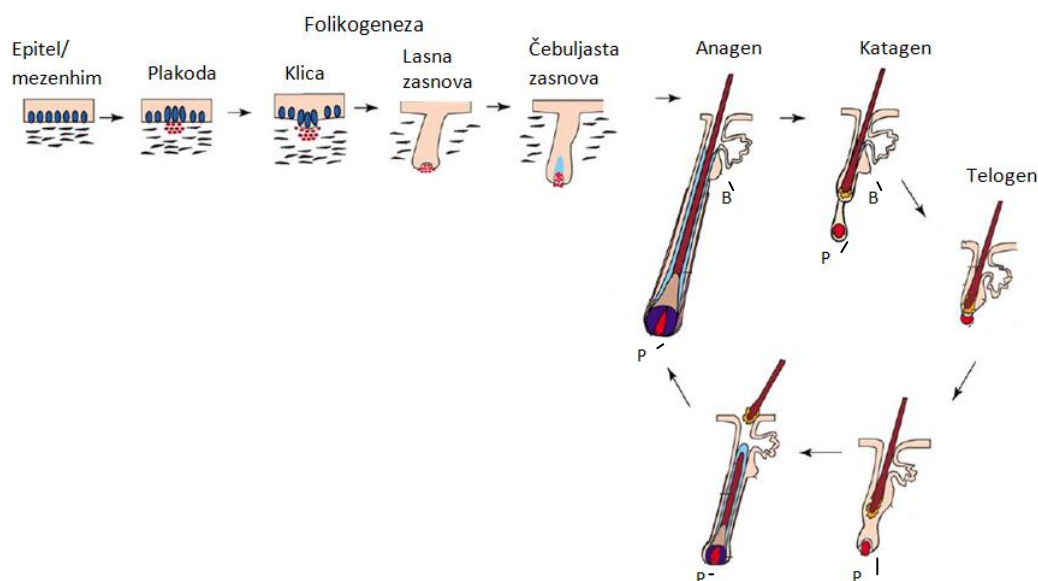
lasišču do približno 100.000 lasnih foliklov, lasni cikel katerih traja 1000 dni, to pomeni, da fiziološko vsak dan izpade do 100 las. Pri različnih boleznih las je to razmerje spremenjeno, v trihogramu pa se lahko pojavijo tudi bolni, distrofični lasje (Kocjančič, 1993).

Razmerje lasnih foliklov, ki so v anagenu, je večje v otroštvu in manjše v starosti. Pri zdravem odraslem človeku je 85—95 % foliklov v fazi anagen, 4—14 % v fazi telogen in 1 % ali manj vseh foliklov v fazi katagen (Rook, 1965).

2.3.2.1 Morfogeneza v zarodku

Raziskava, ki sta jo opravila Paus in Cotsarelis (1999) na podganah, opisuje, da se prvi zametki las oblikujejo 16 dni po začetku brejosti. Takrat je periderm, ki ovija zarodek, odstranjen, oblikovati se prične povrhnjica organizma. V manjši obliki se nadalje pojavijo tudi lasni folikli z oblikovanimi dermalnimi papilami. Podoben, a dolgotrajnejši proces poteka tudi pri ljudeh.

Rast lasnega folikla je razdeljena na 7 faz. V začetni fazi (0) se izoblikuje meja med povrhnjico in usnjico. V fazi 1, ki nastopi med 8. in 12. tednom nosečnosti, se začne oblikovati lasni folikel kot odgovor na signalne elemente iz okolja. V fazi 2 se prično celice povrhnjice zgoščevati in prodirati v usnjico. V 3. fazi, ki nastopi med 12. in 14. tednom nosečnosti, se formira plakoda, ki povzroči zgodnjo »peg fazo« lasnega mešička, oblikuje se tudi dermalna papila. V fazi 4 se pokažejo zametki lasnih ovojev. V fazi 5, ki nastopi med 13. in 16. tednom, se površinski deli lasnega folikla razdelijo v dve asimetrični izboklini. V 6. fazi se oblikuje lasno steblo. V fazi 7, ki je tudi zadnja faza rasti lasnega folikla, las predre povrhnjico (Morioka, 2005; Blume-Peytavi in sod., 2008).

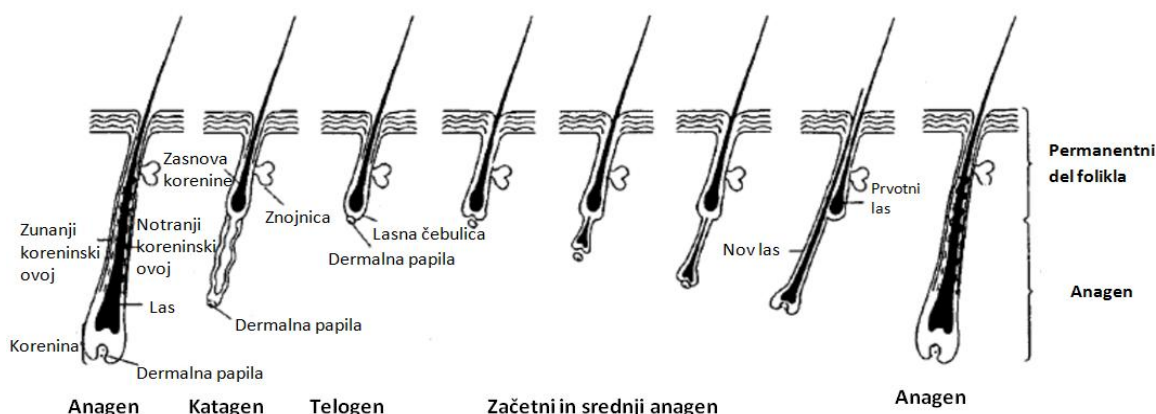


Slika 4: Razvoj lasu in lasni cikel (Stenn in Cotsarelis, 2005:2)

Opis: Spodnji folikel se regenerira pred začetkom vsakega cikla, za svoje delovanje koristi povezavo med epitelnimi in mezenhimskimi interakcijami matičnih celic v čebulici (B) in aktivnost mezenhimskih celic lasne papile (P).

2.3.2.2 Morfogeneza po rojstvu

Glede na čas nastanka las ločimo tri faze poraščenosti pri človeku – primarno, sekundarno in končno poraščenost. Primarna poraščenost se razvije v zarodku in odpade pred porodom ali pa 6 mesecev po rojstvu. Ta tip poraščenosti imenujemo tudi lanugo. Za sekundarno poraščenost so značilne velusne dlake, ki nadomestijo lanugo dlake. To se kaže v obliki puhastih dlačic, ki ostanejo na telesu tudi pozneje. Po 6. letu življenja, ko se okrepijo tudi vse kratke dlake, nastopi končna poraščenost, ki se lahko zavleče tudi do 60. leta življenja (Huster in sod., 1998). Po rojstvu, ko primarni lasje izpadejo, gre vsak novonastali lasni folikel skozi ciklično rast, ki jo uravnavajo številni rastni faktorji in receptorji. Ti so ključnega pomena za normalen razvoj las in delovanje lasnega cikla. Vendar noben od rastnih faktorjev ne igra ključne in dominantne vloge. Faze, ki so jim lasni folikli podvrženi in zaradi katerih lasje rastejo, so: faza rasti (anagen), faza represije rasti (katagen) in faza počitka (telogen) (Paus in Cotsarelis, 1999).



Slika 5: Faze rasti lasu (Randall in Botchkareva 2009: 10)

2.3.2.3 Lasni cikel

Za lasni cikel so značilne tri faze: faza rasti (anagen), prehodna faza (katagen) in faza mirovanja (telogen). Po obliki lasnih mešičkov ugotovimo, v kateri od treh faz je las v določenem trenutku. Lasni cikel uravnava dermalna papila (Godić, 2009).

2.3.2.3.1 Anagen

Anagen je faza rasti, ki se prične s tvorbo novega lasu in je obdobje, ko las aktivno raste. Matične celice v *suprabulbarnem* delu mešička se intenzivno delijo (Godić, 2009). Ko las raste iz lasne čebulice, se lasni mešiček pogreza globlje v usnjico (Hagman, 1998). Podrobneje jo razdelimo v 6 stopenj (Randall in Botchkareva, 2009). Je najdaljši del rastoče faze. Gre za fazo z visoko metabolno in mitotsko aktivnostjo. Folikel se ponovno oblikuje po prejšnji mirujoči fazi v procesu, podobnemu začetnemu razvoju, le da je lasni zametek že prisoten in je lasni kanal, ki ga povezuje s površino kože, že vzpostavljen (Harding in Rogers, 1999; cit. po Karničar, 2007).

Anagen faza I: Lasni zametek začne z mitotsko delitvijo.

Anagen faza II: Folikel raste navzdol okrog dermalne papile, začne se tudi prva diferenciacija germinativnih celic v notranji koreninski plasti.

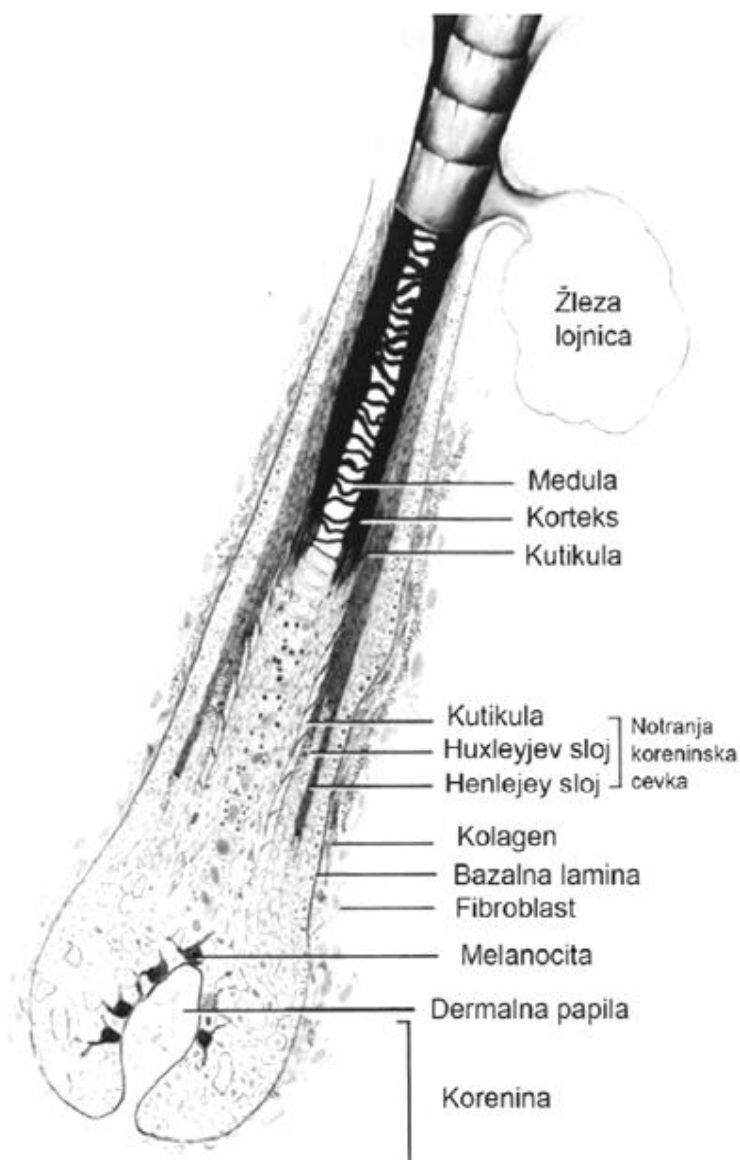
Anagen faza III: Folikel pridobi svojo maksimalno dolžino 4—5 mm, lasna čebulica

obda dermalno papilo. V čebulici lahko vidimo melanocyte, nastane notranja koreninska plast.

Anagen faza IV: Visoka mitotska aktivnosti v celicah čebulice lasu. Vidimo tudi sintezo korteksa in medule ter pigmentne granule. Las se še ne podaljša prek notranje koreninske plasti.

Anagen faza V: Folikel doseže karakteristično obliko čebulice, pri čemer spodnji del čebulice obda dermalno papilo. Konica novega lasu odrine stran starega in doseže epidermis. Proces do te faze traja približno 3 tedne.

Anagen faza VI: Las je viden nad površino kože in naprej raste brez nadaljnjih sprememb folikla, dokler se ne začne faza katagen (Harding in Rogers, 1999; cit. po Karničar 2007).



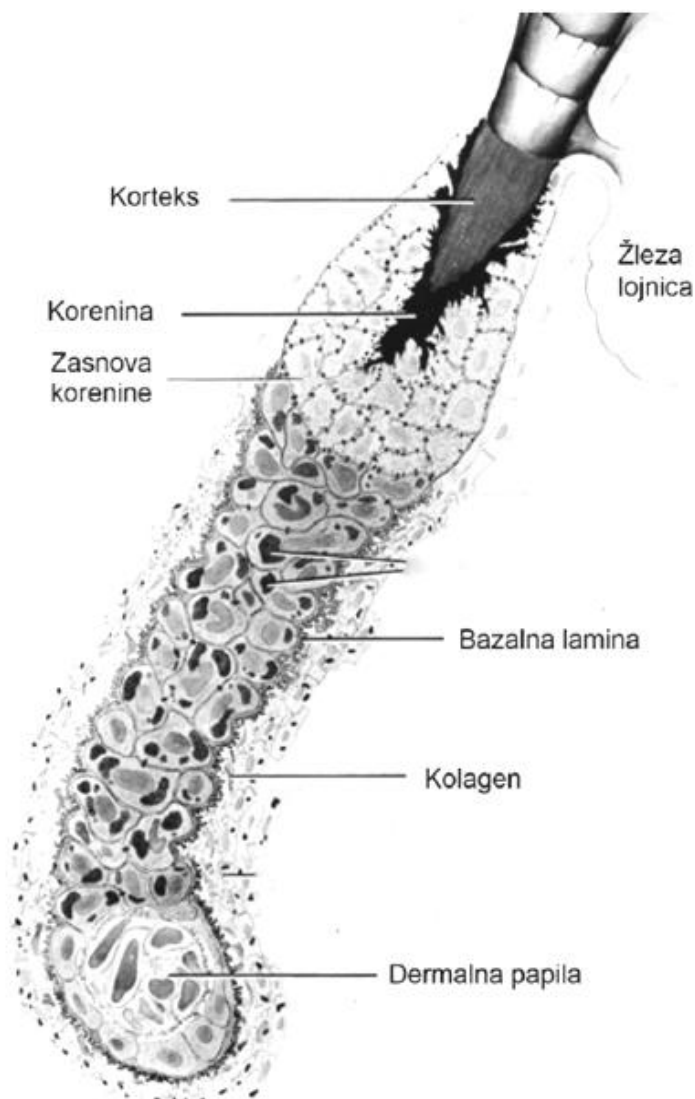
Slika 6: Prikaz folikla v fazi anagen (Parakkal, 1979)

Faza anagen se od drugih faz razlikuje predvsem po spremembah, ki vplivajo na kožo in žilni sistem, saj se žilni preplet ob lasnih mešičkih med fazo občutno poveča (Randall in Botchkareva, 2009).

Anageno obdobje lasu traja pri človeku od 2 do 8 let (Godič, 2009). Las zraste okoli 0,35 mm na dan (Kocjančič, 1993).

2.3.2.3.2 Katagen

Katagen je prehodna faza, traja približno od 3 do 4 tedne (Godić, 2009). V tej fazi se lasna čebulica loči od lasne papile, pri čemer pa las še vedno dobiva hranilne snovi iz sten lasnega mešička. Mešiček, ki ostane pod čebulico, se skrči, nato pa izpade (Hagman, 1998). Zmanjšata se mitotična dejavnost matičnih celic in melanogeneza. Las postane hipopigmentiran. Lasne ovojnice se strukturno spremenijo, bazalna membrana zunanje ovojnice se zadebeli, lasno korenino pa obda fibrozna kapsula. Nastopi apoptoza distalnega dela zunanje lasne ovojnice (Godić, 2009). Dendriti se skrčijo in pigment ni več injiciran v korteks, ki zato postane bled ali bel pri koncu korenine. Celične delitve v lasni čebulici se upočasnijo in sčasoma ustavijo. Celice v zgornjem delu čebulice še naprej potujejo navzgor do folikla in se diferencirajo, sinteza medule in kutikule se ustavi, le korteks ter notranja koreninska plast še vedno nastajata. Ostanejo samo ostanki čebulice. V celicah spodnjega folikla nastanejo vakuole, ki vsebujejo hidrolitične encime. Esteraze in kisle fosfataze napadejo celice folikla, ki posledično razpade. Ostanki celičnega folikla tvorijo epitelno plast med dermalno papilo in lasno zasnovo. Zasnova oz. zametek lasu nastane iz zunanje koreninske plasti nekje na sredini folikla (iz te zasnove oz. zametka se ob iniciaciji rasti tvori nov folikel) (Harding in Rogers, 1999; cit. po Karničar, 2007).



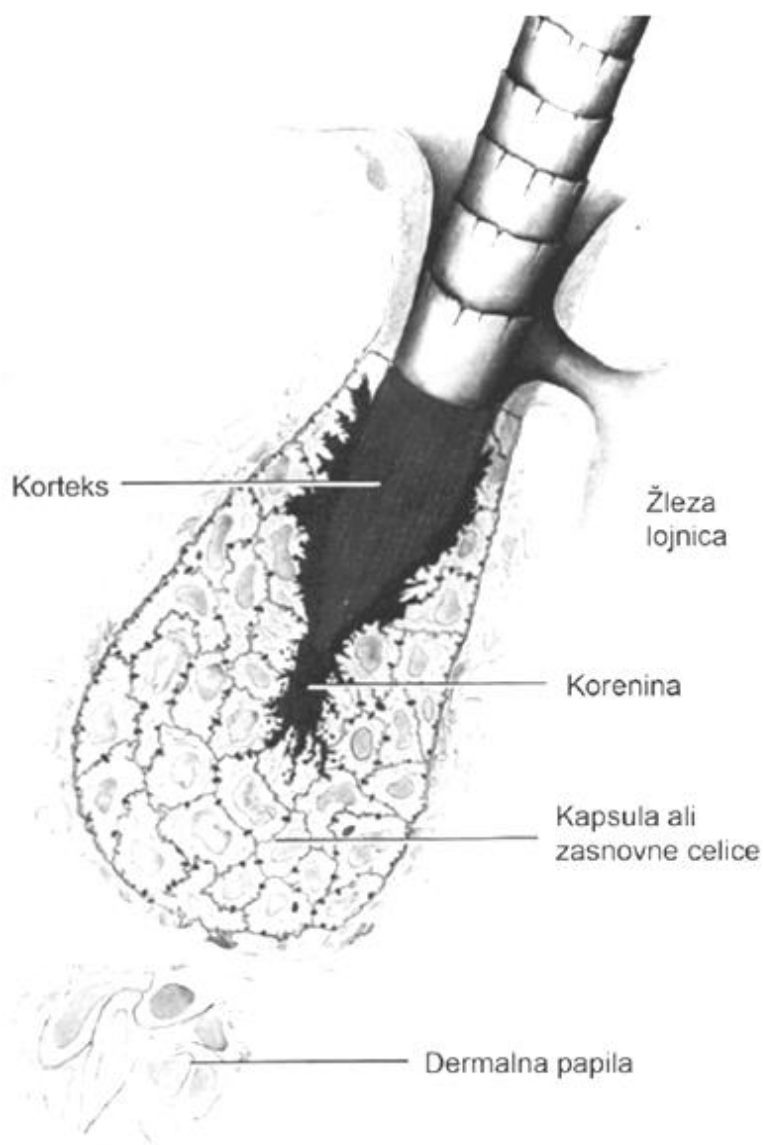
Slika 7: Prikaz folikla v katagen fazi (Parakkal, 1979)

2.3.2.3.3 Telogen

Telogen nastopi, ko se konča katagen, in je obdobje mirovanja lasnega mešička. Traja od 3 do 4 mesecev (Godić, 2009). Mlade lasne celice čakajo, da se bodo razvile iz celic papile in zunanje ovojne plasti čebulice. Lahko se zgodi, da se nov las tvori, še preden stari izpade. V tem primeru novonastali las preskoči fazo katagen (Hagman, 1998). Lasje v fazi telogen so kratki in nepigmentirani, odsoten pa je tudi notranji ovoj. Dermalna papila se tesno drži sekundarnih keratinocit, ki vsebujejo matične celice. Če primerjamo lasni folikel v anagenski fazi in telogenski fazi, ugotovimo, da je v

telogeni fazi dermalna papila kot krogla celic ločena, locirana pod epitelno kapsulo. Germinativnih celic, kutikule in zunanje ter notranje koreninske plasti ni (Harding in Rogers, 1999; cit. po Karničar 2007). Signalna pot Shh je ključna za prestop iz faze telogen v fazo anagen in je odvisna od pravilnega razmerja med rastnimi stimulatorji in inhibitorji. Randall in Botchkareva (2009) navajata, da vlogo stimulatorja za prestop iz faze telogen v fazo anagen predstavlja tudi »noggin«, predstavnik inhibitorjev pa je BMP4. Nekatere raziskave na miših so pokazale, da lahko prehod v fazo anagen povzročijo tudi nekateri imunosupresanti, kot je na primer ciklosporin A. Gafter-Gvili in sod. (2003) v svojem članku navajajo pozitivne rezultate uporabe ciklosporina A tudi na ljudeh. V tem smislu bi se lahko ta potencialno uporabljal kot rastni modulator, saj raziskave kažejo inhibicijo regresije rasti v fazi katagen in aktivacijo rasti v fazi anagen.

Po morfogenezi različni tipi celic ostanejo v določenih regijah folikla. Folikle epitelnih celic lahko na primer zasledimo v foliklu matičnih celic, ki se nahajajo v niši čebulice (ang. bulge). Multipotentne mezenhimske prekurzorje najdemo v celicah dermalne papile, folikle epitelnih matičnih celic v skupku, ki je povezan z mišico naježevalko (Toyoshima in sod., 2012).



Slika 8: Prikaz folikla v fazi telogen (Parakkal, 1979)

2.3.3 Dejavniki vpliva na rast las

2.3.3.1 Signalna pot WNT

Za razumevanje regulacije rasti lasu je potrebno dobro poznavanje kontrolnih mehanizmov diferenciacije in proliferacije celic lasnega folikla. Za nastanek lasu je namreč potreben zahteven mehanizem in usklajeno delovanje med vsemi plastmi kože s pripadajočimi faktorji in celicami. Zato je nemotena komunikacija med posameznimi

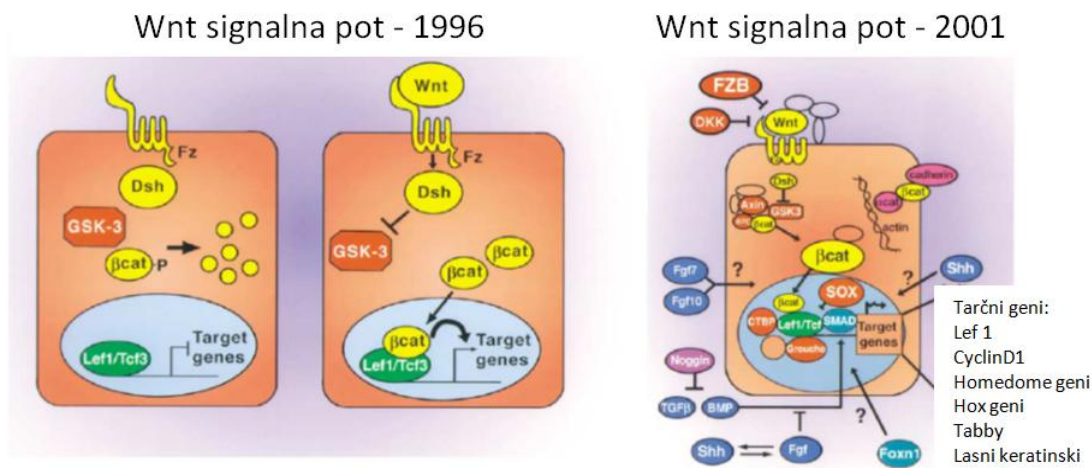
elementi bistvenega pomena. Komunikacija je odvisna od številnih signalnih poti in molekul, med katerimi je signalna pot Wnt nedvomno ena bistvenih, saj odloča o časovnem okviru in determinaciji rasti lasnega folikla (Morioka, 2005).

Od signalne poti Wnt je odvisna indukcija lasnega popka. Wnt–proteini so ekstracelularni regulatorni ligandni proteini, ki se vežejo na površinske celične receptorje Frz. Vezava vodi do aktivacije faktorjev, ki blokirajo aktivnost β -katenin fosforilacijskega kompleksa, kar vodi v večjo stabilizacijo samega β -katenina. Funkcija β -katenina je aktivacija transkripcije faktorja Lef-1, ki se veže na promotorje, kar je bistvenega pomena za produkcijo las. Vezava Lef-1 je nadalje odvisna od Noggin/BMP. Represija aktivnosti proteina BMP inducira sintezo Lef-1. Lef-1/ β -katenin kompleks pa onemogoča ekspresijo E-kadherina, ki je odgovoren za preoblikovanje kožnega kadherina v lasnega. Tako je poleg signalne poti Wnt/ β -katenin tudi sistem Noggin/BMP poleg mnogih drugih bioloških molekul nujen za razvoj in oblikovanje las (Morioka, 2005).

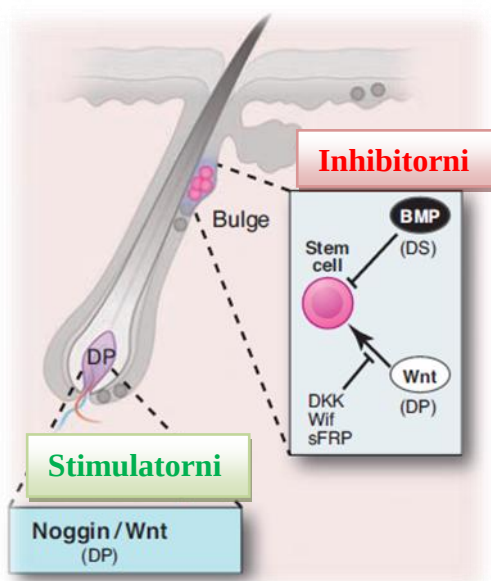
Model signalne poti Wnt je bil objavljen že leta 1996 (Fuchs in sod., 2001) (slika 7, levo). Celica z receptorjem Fz kot odgovor na zunanji signal Wnt preoblikuje drug protein Dsh, ki posledično inhibira kinazo GSK-3. Zaradi te inhibicije se β -katenin ne fosforilira. Začne se akumulirati in se veže v kompleks s proteini iz družine LEF1/TCF. Aktivni transkripcijski faktor nato aktivira tarčne gene v območju »precortex«, kjer obstaja velika verjetnost, da zajame tudi gene za keratin in druge pomembne strukturne komponente, ki tvorijo celice lasnega stebra.

Drugi model poti Wnt pa je bil objavljen leta 2001 (slika 7, desno) (Fuchs in sod., 2001). Receptor Wnt je sestavljen iz proteinov FZB in LRP5/6. Signalizacija lahko poteka z aktiviranim receptorjem, ki je povezan z aksinom, tj. proteinom, potrebnim za izražanje β -katenina preko GSK-3. Več pozitivnih in negativnih dejavnikov je povezanih z β -kateninom in TCF/LEF1. Njihov vpliv je na zmožnost kompleksa, da aktivira zaviralne tarčne gene. Zunanji signali, kot so BMP, TGF- β , FGF, Shh idr., stimulirajo transdukcijske poti v epitelijskih celicah. Te poti so poznane po svojem vplivu na sam potek poti Wnt. Ločeno od teh interakcij poteka aktivacija genov, ki

kodirajo transkripcijske faktorje, kot so npr. *hox13* in *msx1*, kakor tudi druge lasne proteine in keratine (Fuchs in sod., 2001).



Slika 9: Shematski prikaz signalnih poti Wnt, znanih leta 1996 in 2001 (Fuchs in sod. 2001: 10)



Slika 10: Lasni stimulatorji in inhibitorji (Li in Clevers, 2010: 545)

Opis: Lasna čebulna regija proizvaja signale Wnt-izklop in BMP-vklop in s tem ohranja mirovanje matičnih celic, medtem ko dermalna papila (DP) proizvaja stimulatorne Wnt-vklop in BMP-izklop signale.

2.3.3.2 Rastni faktorji

Pri predpostavki, da so lasje »organ«, lahko rečemo so rastni faktorji skupaj z ostalimi regulatornimi molekulami glavni dejavniki, ki sprožijo celične odgovore in povzročijo medcelično komuniciranje. To pripelje do diferenciacije (celic lasnega folikla) in razvoja morfologije las. Biološki dejavniki, katerih glavni funkciji sta regulacija in stimulacija, sodijo v družino polipeptidov. Njihova funkcija je odvisna od ostalih biološko aktivnih elementov, stanja celične diferenciacije in časovnega okvirja. Najpogostejše družine rastnih dejavnikov sestavljajo epidermalni rastni dejavniki (EGF), fibroblastni rastni dejavniki (FGF), transformacijski rastni dejavniki β (TGF- β), inzulinu podobni rastni dejavniki (IGF), možganski nevrotrofni dejavniki (NGF), hepatocitni rastni dejavniki (HGF) in rastni dejavniki žilnega endotelija (VEGF) (Peus in Pittelkow, 1996).

Preglednica1: Glavni predstavniki rastnih faktorjev in njihove funkcije (Peus in Pittelkow, 1996)

Rastni dejavniki	FUNKCIJA
EGF	Stimulira proliferacijo lasnih foliklov. Izraža se v zunanjem koreninskem ovoju, ki je sosedni regiji, kjer poteka keratinizacija vlaken. Receptorji za te dejavnike se nahajajo na membranah vseh celic, ki sestavljajo enoto lasu; od lasne čebulice do zunanjega koreninskega ovoja.
FGF	Dejavniki FGF imajo široko biološko aktivnost in so vključeni v nadzor tako normalnih kot tudi transformiranih celic med rastjo, morfogenezo itd. Primarno delujejo na proliferacijo fibroblastov, melanocit in celic v papili. Sledi spodbujanje mitotske delitve keratinocit in endotelijskih celic. Specifični receptorji FGF so lahko prisotni v celici, ki izloča dejavnike, ali v sosednji.
TGF-β	Do danes so bile prepoznane tri izoforme TGF- β , katerih glavna naloga je sodelovanje v celični proliferaciji, diferenciaciji fibroblastov in mezenhimskih celic. Zavirajo rast normalnih epitelijskih celic, kot so epidermalni keratinociti. Ligandi TGF- β se izločajo v neaktivni obliki iz keratinocit pred fazo katagen. Močno regulatorno vlogo so pokazali v rasti kot element notranjega koreninskega ovoja, preko katerega tudi skrbijo za regulativno vlogo.

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1

Rastni faktorji	FUNKCIJA
IGF	Rastni dejavniki iz družine IGF imajo podobno zaporedje aminokislin, kot jih najdemo pri molekuli inzulina. Znana sta predvsem dejavnika IGF-I in IGF-II, pri čemer se prvi pojavlja pri razvoju las v zarodku, drugi pa pri odraslih osebah. Oba spodbujata razmnoževanje mezenhimskih in epitelnih celic.

2.3.3.3 Hormonski in nevronske dejavniki

V Preglednici 2 so predstavljeni biološki dejavniki, ki vplivajo na stanje lasnega folikla. Skupaj s funkcijami so opisani tudi glavni predstavniki hormonskih in nevronske dejavnikov. Njihovo delovanje je uravnavano na podlagi pozitivnih in negativnih povratnih zank, ki se odvijajo v lokalnem tkivu in med različnimi celicami.

Preglednica 2: Hormonalni in nevronske faktorji ter njihov vpliv (Paus in Cotsarelis, 1999)

MODULATOR		AKTIVNOST
Endogeni	Androgeni	Pospešijo zmanjševanje in krajšanje foliklov med fazo anagen; med adolescenco pospešijo in povečajo folikle.
	Estrogeni	Podaljšajo fazo anagen.
	Rastni hormoni	Delujejo sinergijsko z androgeni med adolescenco in mutiranjem.
	Prolaktin	Povzroči lahko poraščenost.
	Tiroksin	Povzroča krajšanje faze telogen.
Eksogeni	Anabolni steroidi	Pospešujejo izpadanje las; podobno kot androgeni.
	β -adrenergični antagonisti	Povzročajo krajšanje faze telogen.
	Ciklosporini	Pretirana rast las.
	Estrogeni	Podaljšajo fazo anagen, nevtralizirajo telogen in povzročajo androgeno alopecijo.
	Finasteridi	Blokirajo reduktazo 5 α tipa 2; inhibirajo zmanjševanje foliklov; podaljšujejo fazo anagen v foliklih, ki so odvisni od androgenov; spreminjajo puh v končno obliko las.
	Minoxidil	Sproži in podaljša fazo anagen in spreminja puh v končno obliko las.
	Retinoidi	Lahko povzročijo prezgodnje izpadanje las ali prezgodnji prestop v fazo katagen.

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2

Eksogeni	MODULATOR	AKTIVNOST
	Fenitoin	Povzroči hipertrihozo.
	Oralna kontracepcija	Prezgodnji prestop v fazo anagen.

2.3.3.4 Vpliv matičnih celic na rast lasu

Matične celice izločajo rastne dejavnike in s tem vplivajo na regulacijo rastnih ciklov. Belo maščobno tkivo vsebuje celice, ki preko akumulacije ali sproščanja maščobne kisline regulirajo hrambo energije. Odrasle adipozne celice sestavljajo večino gmote belega maščobnega tkiva. Slednja vsebuje tudi različne tipe neodraslih adipocitnih prekurzorjev, krvne celice, makrofage in endotelne celice. V prehodnem času med fazama telogen in anagen se aktivirajo progenitorske adipozne celice, ki proliferirajo in oblikujejo nove odrasle adipozne celice, ki obkrožijo nov lasni folikel. Te nedozorele adipozne celice izločajo dejavnik PDGF, ki je signal za začetek anagena. Odrasle adipozne celice izločajo leptin, adiponektin in BMP2, ki lahko olajša rast lasu (Schmidt in Horsley, 2012).

Festa in sod. (2011) opisujejo, da vloga celic, ki predstavljajo nišo epitelnih celic za homeostazo in regeneracijo kože, še ni popolnoma definirana. Niša tkiva je esencialnega pomena za ohranjanje samoohranjevanja in diferenciacije matičnih celic (Voog in Joanes, 2010). Niša lasnih folikularnih matičnih celic se nahaja znotraj regije čebulice. Te celice so odgovorne za vzdrževanje neprekinjene in ponavljajoče se regeneracije lasnega folikla med lasnim ciklom. Zunanji signali, kot so BMP, FGF, PDGF in Wnt, lahko aktivirajo matične celice v lasnem mešičku. Kljub temu ostaja nejasno, katere celice tvorijo nišo matičnih celic kože (Festa in sod. 2011).

Celice, izolirane iz maščobnega tkiva, so podobne mezenhimskim matičnim celicam¹ znotraj stromalno-vaskularne frakcije podkožnega maščobnega tkiva, ki imajo možnost samoobnovitve in razvojne plastičnosti. Skupaj z matičnimi celicami iz kostnega mozga si delijo podobne površinske označevalce, genski profil in funkcije. Esencialna funkcija

¹ Navajajo tudi Panfilov in sod. (2013), Zuk in sod. (2001, 2002) in Barry in Murphy (2004).

celic, izoliranih iz maščobnega tkiva, je proizvodnja in izločanje rastnih dejavnikov, ki aktivirajo sosednje celice. Ti rastni dejavniki vključujejo VEGF, HGF, IGF in PDGF (Park in sod., 2010).

2.3.4 *In vitro* gojenje

2.3.4.1 Merjenje rasti lasu

Med zgodovino so se oblikovale mnoge metode, s katerimi ugotavljamo in vrednotimo rast las, tako *in vivo* kot tudi *in vitro*. Na splošno delimo metode na invazivne (biopsija), delno invazivne (trihogram) in neinvazivne (štetje). V zgodnjih 60. letih 20. stoletja so znanstveniki opisovali in merili rast s pomočjo optičnega mikroskopa, kasneje se je tej metodi pridružila še računalniška analiza. S temi pristopi so bili raziskovalci omejeni, saj jim niso omogočili avtomatičnega procesiranja podatkov in analize. Raziskovanje se je nadaljevalo s pomočjo metode fototrihograma, ki se je izkazala kot primerna in neinvazivna tudi za merjenje *in vivo*. Metodo so kasneje izboljšali s slikovno analizo, s pomočjo imerzijskega olja in s pomočjo digitalnega kontrastiranja. Večkrat so te metode poskušali avtomatizirati in digitalizirati, saj so se izkazale kot časovno zamudne. Avtomatizacija je bila onemogočena zaradi sposobnosti lasnih foliklov na glavi, da rastejo v skupinah in tako onemogočajo vizualno primerjavo (Blume-Peytavi in sod., 2008).

2.3.4.2 Modeli za rast las v pogojih *in vitro*

Najpogosteje se za rast in raziskovanje morfologije in diferenciacije las uporabljajo gojišča z različnimi dodatki, kot so serum, hormoni, antibiotiki itn. Z znanjem izolacije in karakterizacije celic iz tkiva so se kot model za *in vitro* gojenje las v ospredju pojavile tudi celične kulture (Marinko, 2010).

Poznamo tri načine, in sicer celične kulture, tkivne kulture in 3D-modele za rast. Njihovo uporabnost je opisala sodelavka na projektu Živa Marinko v svoji diplomski nalogi (Marinko, 2010).

2.4 PREDSTAVITEV PODROČJA BIOUMETNOSTI

Tako kot se s časom spreminja jezik, ki je živ, se skladno z napredkom v tehnologiji in raziskavah razvija tudi umetnost. V sodobnem svetu stremimo k čim večjemu povezovanju med različnimi inštitucijami in s tem brišemo meje nam znanega ter običajnega. Kot produkt se je razvila bioumetnost, oblika sodobne umetnosti, za katero je značilna interdisciplinarnost, kar se odraža v sodelovanju z naravoslovnimi znanstveniki, v delovanju v laboratorijskem okolju in v rabi specifičnih biotehnoloških orodij ter znanj. Znanost in umetnost se tako dopolnjujeta in delujeta komplementarno in ne tekmovalno ali konkurenčno (Art&Science ..., 2008).

Prve opaznejše zametke bioumetnosti oz. vzporednice med znanostjo in umetnostjo opazimo že v renesansi z umetnikom Leonardom da Vincijem, ki je s svojimi risbami in slikami povzdignil anatomsko zgradbo človeka na višji nivo ter s tem javnosti predstavil nevideno (Art&Science ..., 2008). Leonardo da Vinci je poleg Michelangela Buanorrotija in Alberta Dürerja izrazil interes za anatomijo v umetnosti. Vsi naštetih umetniki so v skladu z renesančno doktrino, po kateri je bilo v središču zanimanja človeško telo, sami raziskovali anatomijo telesa z odpiranjem trupel. Med interesi posamičnih umetnikov bi lahko razlikovali – če je Leonardo skušal telo raziskati bolj tehnično, mehanično, pa si je Michelangelo s študijem mišic skušal pomagati pri upodabljanju dinamičnih teles (v gibanju). Anatomsko raziskovanje je bilo v renesansi priljubljeno v umetnosti, a tudi obratno – francoski anatomist Honore Fragonard je konec osemnajstega stoletja sledil delu renesančnih umetnikov in naprednejši študij anatomije navezal na umetnost. S sredstvi, ki so bila tisti čas na voljo, je izdelal do danes edini ohranjen anatomski kip v celotni velikosti človeka: mladega fanta, ki jezdi konja (Tratnik, 2010).

Znanost in umetnost sta se v 19. stoletju razdvojili v popolnoma ločena nesorodna svetova, od katerih je bil en bil namenjen znanstvenim odkritjem, drugi pa iskanju človeške identitete (Art&Science ..., 2008).

Revolucionarni val v šestdesetih letih prejšnjega stoletja je dokončno sprožil val umetnosti novih medijev: performans, happening, land art, body art, video, instalacijsko umetnost itd. Pozneje je sledilo še več »novomedijskih« umetnosti: računalniška, internetna, kibernetika, zvočna umetnost, pa tudi bioumetnost in druge. V poznih 80. letih prejšnjega stoletja je komunikolog Vilem Flusser napisal serijo esejev o odkritjih v znanosti, v katerih je obravnaval življenje, genetsko informacijo, ustvarjanje novih form, evolucijo ipd. S temi spisi je Flusser uvedel biotehnološki diskurz v svet umetnosti in predlagal, da se umetnost neposredno loti manipuliranja z živim materialom. Zadnji esej iz te serije, ki je bil prvotno naslovljen »O znanosti« in je pozneje pridobil naslov »Modri psi«, je postal neke vrste manifest za bioumetnost (Tratnik, 2010).

Po besedah Janeza Potočnika, takratnega evropskega komisarja za znanost in raziskave, je interakcija znanosti in umetnosti pomembna za medsebojno razumevanje, saj se nenehno spreminjata in skupaj predstavljata zanimiv potencial. Prav tako omogočata zbliževanje različnih kultur, pritegneta pozornost na določene tematike, kot so na primer klimatske spremembe in genska modifikacija, ter služita kot orodje za boljše razumevanje sveta okoli nas (Art&Science ..., 2008).

Z vzponom zanimanja za manipuliranje z živim in z novimi možnostmi transformacijskih procesov vse več umetnikov v svojo prakso vključuje biotehnologijo. Pojavila so se tako imenovana vlažna dela (wetworks, angl.), ki ne manipulirajo le s programsko opremo, temveč dejansko uporabljajo živ material v sedanjem času (Tratnik, 2010).

Pomemben aspekt umetnosti v modernosti je bila njena težnja k inovativnosti, ki je predstavljala odpor proti vse bolj industrializiranemu in standardiziranemu svetu in kulturi. Moderna umetnost je bila poleg tega vezana na proizvodnjo umetniških del kot ročno izdelanih proizvodov ali artefaktov in je posebej cenila unikatnost proizvoda. V drugi polovici dvajsetega stoletja so bili številni tehnološko podprti mediji v polnem razmahu in so bili uporabljeni tudi v umetnosti – t. i. digitalna revolucija v kulturi se je zgodila praktično sočasno s t. i. koncem umetnosti. Z vzponom tehnoznanosti v

življenju se je odprlo vprašanje biotehnološke revolucije. Okolje, človeštvo in kultura se bodo v prihodnosti le še bolj spreminjali s posredovanjem biotehnologije. Sodobna umetnost je našla svoje poslanstvo v odgovarjanju na te aspekte v družbeni realnosti (Tratnik, 2010).

Metodološki pristopi takšne umetnosti so lahko znanstveni ali biotehnološki, zato umetniške prakse uporabljajo ista ali enaka (posebej vzpostavljena) delovna okolja, tehnike, postopke, veščine in znanja kot biotehnologija. Polja in discipline prehajajo druga v drugo in se pojavljajo v transstrukturah. Biotehnološka umetnost aktivno sovpada v biotehnološki diskurz; bioumetnik je postal v njem poseben agens. Vendar pa imata umetnost in humanistika drugačne družbene funkcije kot biotehnologija, saj nista usmerjeni v praktične in ekonomske cilje, temveč se pojavljata kot reflektivni praksi (Tratnik, 2010).

Večina biotehnoloških umetniških projektov je tehnološko in organizacijsko zelo zahtevnih in nastajajo v sodelovanju z nekaterimi biotehnološkimi ustanovami. Nekateri umetniški programi so se razvili v tej smeri – npr. Symbiotica center na Univerzi Zahodne Avstralije, ki se zanaša na sodelovanje s Fakulteto za agrikulturo in ponuja umetnikom rezidenco, kjer lahko delujejo na področju bioumetnosti. A v zvezi z eno od potez bioumetnosti se pojavljajo kritike, da tovrstni projekti prevzamejo predvsem didaktično vlogo v odnosu med biotehnologijo in javnostjo, kjer umetnost zgolj predstavlja ali ponovno predstavlja (torej ponavlja ali celo poenostavlja) tisto, kar je že bilo narejeno v polju biotehnologije, pri čemer naredi zgolj to, da prenese nekatere (enostavne ali zelo običajne biotehnološke) dosežke v drug kontekst, ki je umetniški (Tratnik, 2010).

V skladu s kritikami bioumetnosti številni bioumetniški projekti tako poskušajo prevzeti vlogo kritičnega agensa v diskusiji, vendar pa številni pristopi prej izpadejo kot zgolj popularizacija biotehnologije. Kritizirani umetniški projekti so do neke mere utemeljeni interdisciplinarno, vendar pa ne tudi transdisciplinarno. V transdisciplinarnem projektu ne bi bilo hierarhije disciplin, pri tem pa bi bila dejanska biotehnološka vrednost projekta višja oz. enako pomembna kot druge vrednosti projekta – umetniška,

humanistična idr. Umetnost v takšni obliki sodelovanja dobiva nove, pomembne družbene funkcije, ki niso več usmerjene v ilustrativno prikazovanje in metaforično izražanje. Oblike sodelovanja z drugimi polji in disciplinami so vse manj provizorične in enostavne, zato tudi umetnik ne more biti zgolj umetnik. Obenem pa se ne sme pozabiti, da šele z relativnim biotehnološkim raziskovanjem znotraj takšnega hibridnega (transumetniškega) projekta, ki ga lahko koordinira umetnik, sočasno raste družbena funkcija umetnosti kot resnega agensa v diskurzu o biotehnologiji (Tratnik, 2010).

3 MATERIALI IN METODE

Raziskavo smo razdelili na dva dela. V prvem (umetniškem delu) smo proučevali rast lasnega folikla in podaljševanje las, v drugem delu smo se osredotočili na optimizacijo celotnega procesa pridobivanja celic iz maščobnega tkiva. V ta namen smo izbrali tehniko liposukcije in pripravili delovni protokol. Po izolaciji celic nas je zanimala vsebnost mezenhimskim podobnih matičnih celic v maščevju. Park in sod. (2009) v svoji raziskavi navajajo, da so celice, ki jih izoliramo iz maščobe, pretežno podobne mezenhimskim matičnim celicam.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Preiskovanci

V študijo smo vključili prostovoljne darovalce, ki so ostanek tkiva, ki je ostal po rutinski operaciji (npr. lepotni poseg na področju lasišča), darovali v namene projekta Bios *in vitro*. Projekt je odobren s strani Komisije RS za medicinsko etiko (vloga št. 108/08/10).

Po pregledu objav o izolaciji lasnega mešička in vzdrževanju viabilnosti smo uporabili protokol Philpott in sod. (1989).

3.1.2 Laboratorijski pribor in material

William's medium E (- glutamin) (Gibco)

1 % FBS (namesto *calf* seruma)

2,5 µl/ml Fungizone (FUN) (Gibco)

1mM-L- glutamin (Gibco)

100 u/ml Penicilin/streptomycin (P/S) (Gibco)

PBS (Sigma)

Hemocitometer (Sigma)

10 µl/ml Human transferin (Sigma)

Sterilni skalpeli

Sterilne pincete za enkratno uporabo

Laboratorijski potrošni material (petrijevke, epice, pipete, falkonke)

BioStation IM CELL S1 (Nikon, Japonska)

Raztopina za čiščenje (50 ml)

- 50 ml PBS

- 500 µl P/S

- 500 µl FUN

Hranilni medij oz. gojišče (50 ml)

- 50 ml William's medij E

- 500 µl FBS (namesto *calf* seruma)

- 250 µl L-glutamin

- 10 µl Transferin

- 500 µl FUN

- 500 µl P/S

3.2 METODE

3.2.1 Potek dela v laboratoriju po prejetju tkiva

Po prejemu vzorcev smo v brezprašni komori pod lupo najprej secirali tkivo in na ta način izolirali lasne mešičke od okoliškega tkiva. Pri tem smo pazili, da smo s tkivom ravnali nežno, saj stres lahko pomeni zaključek lasnega cikla, ker so lasje zelo občutljivi. Izolirane lase smo nato dvakrat sprali v pripravljeni raztopini za čiščenje in jih dali v hranilni medij oz. gojišče.



Slika 11: Kirurški odvzem tkiva

Del tkiva v hranilnem mediju smo gojili v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂. Preostanek uspešno izoliranega lasu smo prenesli v napravo BioStation, kjer smo spremljali dogajanje v lasu v realnem času. Več v naslednjem sestavku Uporaba naprave BioStation IM CELL S1.

3.2.2 Uporaba naprave BioStation IM CELL S1

Naprava BioStation IM CELL S1 (v nadaljevanju BioStation) je aparat, ki združuje klasični inkubator za gojenje celic in svetlobni mikroskop. BioStation nam omogoča gojenje lasnega folikla in sekvenčno slikanje našega preparata v določenih časovnih intervalih. Pridobljene slike iz določenih časovnih intervalov smo združili v film.

Naprava je sestavljena iz ohišja, ki zagotavlja potrebne pogoje za rast celic (0,5 % CO₂, 37 °C, možnost 95 % vlage in več), z dodanimi aparaturami pa lahko služi tudi kot bioreaktor, ki omogoča dovajanje in odvajanje zraka ali medija brez motenja vzpostavljenih pogojev za rast celic ter ob vzdrževanju aseptičnih pogojev (BioStation IM cell, 2009). Da bi preprečili morebitno kontaminacijo kulture, smo v času eksperimenta BioStation hranili v brezprašni komori.



Slika 12: BioStation (BioStation IM-Q, 2012)

3.2.3 Protokol za izolacijo celic iz maščobnega tkiva

Pri pregledu objav na tematiko izolacije celic iz lipoaspirata smo uporabili dognanja iz naslednjih znanstvenih prispevkov: Yoshimura (2006), Garcia-Olmo (2009) in Yoshimura (2008), ki smo jih na podlagi znanja in izkušenj v podjetju Biobanka d.o.o. še nagradili.

Maščobno tkivo, ki smo ga pridobili z liposukcijo, smo obdelali še isti dan. V kolikor to ni bilo izvedljivo, smo vzorec čez noč shranili v hladilniku (+ 4 °C) in ga obdelali naslednji dan.

Kadar smo tkivo shranili preko noči, smo ga pred obdelavo ponovno ogreli, da se je strjena maščoba zmehčala (cca 30-minutna inkubacija na 37 °C).

Pred pričetkom obdelave vzorca smo si pripravili raztopino kolagenaze in raztopino za inaktivacijo kolagenaze. Raztopino smo prefiltrirali skozi mikrobiološki filter z velikostjo por 0,22 µm.

Preglednica 3: Raztopina kolagenaze

Sestavina	Volumen (100 ml)	Koncentracija v raztopini	Konc. kolagenaze v mešanici (lipoaspirat + razt. kolagenaze)
Kolagenaza NB 6 GMP	150 mg	0,3 PZ U/ml	0,15 PZ U/ml
PBS	50 ml		

Preglednica 4: Raztopina za inaktivacijo kolagenaze

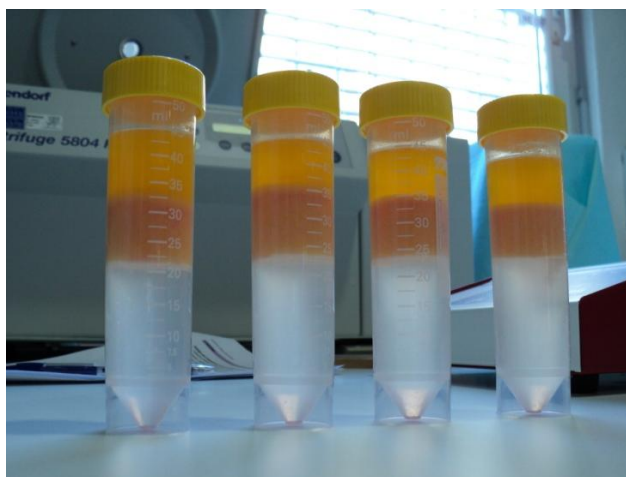
Sestavina	Volumen (100 ml)	Koncentracija v raztopini	Konc. kolagenaze v mešanici (lipoaspirat + razt. kolagenaze)
Albumin	20 ml	20 %	10 %
Fiziološka raztopina	80 ml		

V zaščitni mikrobiološki komori smo iz brizge, transportne posode oz. lončka prenesli po 20—25 ml maščobe v 50 ml centrifugirke. Za spiranje vzorca smo uporabili sterilno fiziološko raztopino za intravenozno uporabo (NaCl) ali PBS – količina je bila približno enaka volumnu lipoaspirata. Vzorec smo centrifugirali 7 minut na 400 g. Po centrifugiranju smo dobili 4 sloje (Slika 13).



Slika 13: Ločitev vzorca po centrifugiranju

Pred vnovičnim centrifugiranjem smo s pipeto skozi maščobno plast odstranili pelet (krvne celice) in supernatant. Pri tem smo pazili, da nismo zraven prenesli maščobnega tkiva in maščobne tekočine. Nato smo dodali PBS in ponovno centrifugirali. Spiranje smo ponavljali, dokler nismo odstranili večine krvi (3-krat). Po zadnjem centrifugiranju smo odstranili spodnjo tekočo fazo (Slika 14).



Slika 14: Vzorec po zadnjem centrifugiranju

V centrifugirko s spranim maščobnim tkivom smo dodali cca. 20 ml raztopine kolagenaze za razgradnjo. Pri tem smo bili pozorni, da centrifugirke niso bile popolnoma napolnjene, da smo lahko vsebino učinkovito premešali. Centrifugirke smo nato 40 min inkubirali na 37 °C in jih med tem časom večkrat premešali. Po končani inkubaciji smo v centrifugirke dodali raztopino za deaktivacijo kolagenaze (10 % humani albumin). Pri tem smo pazili, da je bil volumen raztopine za deaktivacijo 2-krat večji od volumna raztopine kolagenaze (volumen maščobnega tkiva : volumen kolagenaze : volumen za inaktivacijo = 1 : 1 : 2). Celično suspenzijo v centrifugirki smo nato filtrirali oz. previdno prenesli s pipeto na 100 µm celično sito. Vsako prazno centrifugirko smo še enkrat sprali s fiziološko raztopino in vse preko celičnega sita prenesli v novo centrifugirko. Celično suspenzijo smo centrifugirali 7 minut na 400 g. Pred ponovnim centrifugiranjem smo odstranili supernatant in pelet raztopili v fiziološki raztopini. Postopek smo ponovili 2-krat, nakar smo odstranili supernatant, pelet pa smo

resuspendirali v 2 ml NaCl, ki je vsebovala 2 % humanega albumina. Resuspendirane celice smo nato pripravili za štetje celic in določanje viabilnosti.

Delo smo opravljali v skladu z dobro laboratorijsko prakso in upoštevanjem predpisov celičnega raziskovalnega laboratorija v podjetju Biobanka d.o.o.

3.2.4 Štetje celic

Za štetje celic smo uporabili 3 metode, in sicer:

a. Določanje viabilnosti z aparatom COUNTESS (Invitrogen)

V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 10 μ l ustrezno razredčene celične suspenzije. Nato smo dodali 10 μ l tripanskega modrila in nežno resuspendirali. 10 μ l suspenzije smo nanesti v vdolbinico na ploščici in ploščico vstavili v aparat. Metodo smo uporabili za določanje viabilnosti izoliranih celic.

b. Štetje s hematološkim analizatorjem (Beckman coulter Act Diff 2)

V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 100 μ l ustrezno razredčene celične suspenzije. Nato smo centrifugirko postavili pod sesalno iglo in pritisnili gumb za začetek meritve. Po analizi vzorca smo izračunali število celic v volumnu 100 ml. Metodo smo uporabili za določanje števila celic.

c. Štetje s hemocitometrom (Sigma)

V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 10 μ l ustrezno razredčene celične suspenzije. Temu smo dodali 10 μ l tripanskega modrila in nežno resuspendirali. Barvilo vstopi v mrtve celice, ki jih posledično obarva modro. 10 μ l suspenzije smo nanesti na Bürker-Türkovi hemocitometer. Celice smo nato prešteli pod mikroskopom in kasneje izračunali število celic v volumnu 100 ml. Z metodo smo samo preverili, ali so rezultati, ki smo jih prejeli z uporabo naprave COUNTESS, primerljivi.

Skupno število živih in mrtvih celic v suspenziji smo računali po naslednji formuli:

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

N = skupno število živih/mrtvih celic v suspenziji

n = povprečno število prešteti živih/mrtvih celic v kvadratu

R = faktor redčenja zaradi mešanja s tripanskim modrilom

V = volumen celične suspenzije, iz katere smo vzeli vzorec (ml)

Odstotek živih celic (%) = (število živih celic/skupno število vseh celic) x 100

3.2.5 Prekrivanje gojilnih posodic z želatino

Gojilne posodice, ki smo jih uporabili v napravi BioStation, smo prekrili z 0,1 % želatino, saj smo menili, da se bo las bolj pritrdil na površino. V 35-mm petrijevko smo dodali 1,5 ml 0,1 % želatine in inkubirali 30 min. Po inkubaciji smo odstranili odvečno želatino, dodali hranilni medij in lasno tkivo ter jo namestili v napravo BioStation.

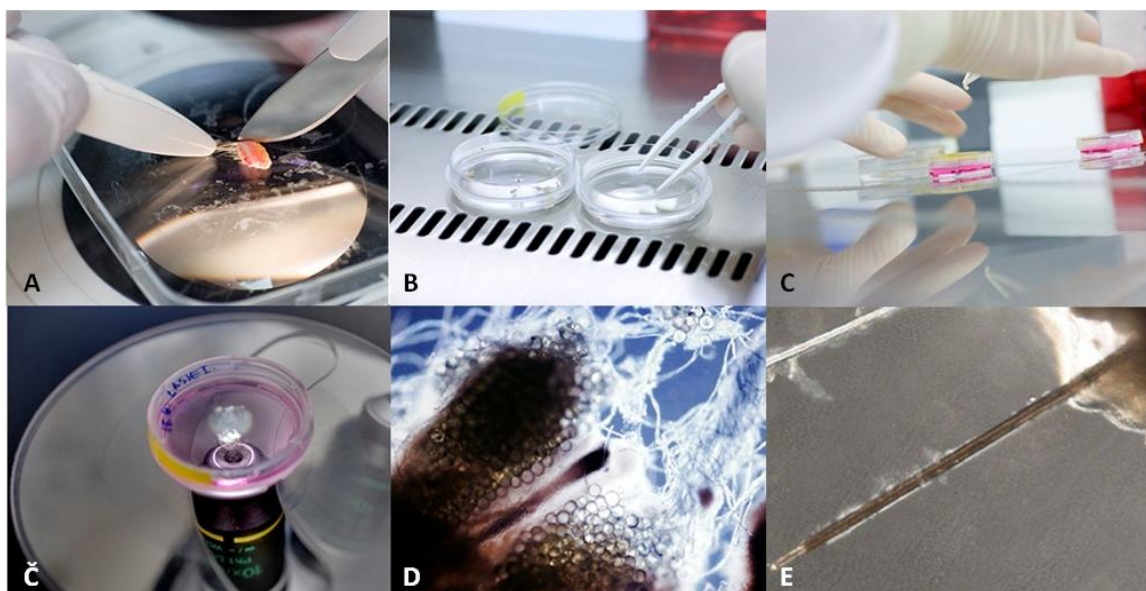
Želatino smo uporabili za boljšo fiksacijo lasnega tkiva na gojilno posodico, ki smo jo dali v napravo BioStation in določili vidno polje sekvenčnega slikanja naprave.

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA LASNEGA MEŠIČKA, UPORABA NAPRAVE BIOSTATION IN OPAZOVANJE LASNEGA CIKLA

Slika 15 prikazuje potek dela v laboratoriju po prejemu vzorcev. Najprej smo v brezprašni komori pod lupo secirali tkivo in na ta način izolirali lasne mešičke od okoliškega tkiva (A). Pri tem smo pazili, da smo s tkivom ravnali nežno, saj bi kakršen koli stres pomenil zaključek lasnega cikla, ker so lasje zelo občutljivi. Izolirane lase smo dvakrat sprali v pripravljeni raztopini za čiščenje (B) in jih nasadili v hranilni medij oz. gojišče (C). Vzorec smo pogledali pod mikroskopom (Č in D). Del tkiva v hranilnem mediju smo spravili in vzdrževali v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂ (D in E).

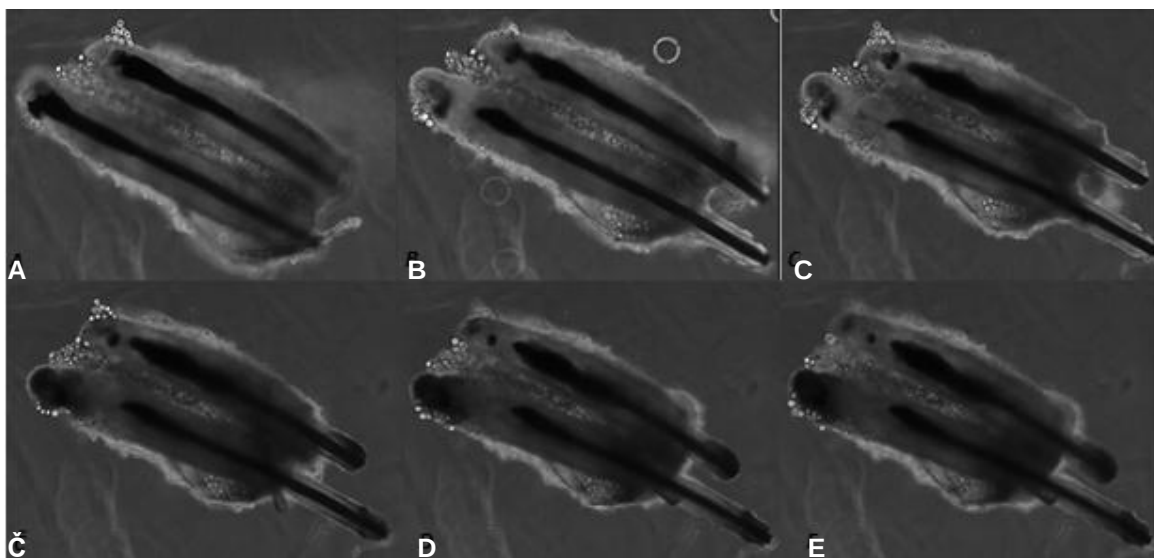
Preostanek uspešno izoliranih las smo prenesli v BioStation, kjer smo spremljali dogajanje v lasu.



Slika 15: Prikaz postopka od prejetja tkiva do izolacije lasnega mešička in pregled vzorca pod mikroskopom

BioStation smo v eksperiment vključili v začetni fazi, saj nas je zanimala vizualizacija biološkega dogajanja. Sam proces v napravi BioStation je potekal 3 tedne. Ker je bila za realizacijo naše zamisli zmogljivost vidnega polja pri napravi BioStation majhna, smo v ta namen naredili mrežo velikosti 6x5 vidnih polj. Zaradi tresljajev in posledično premika vzorca iz vidnega polja smo v času slikanja povečali vidno mrežo na 7x7 vidnih polj. Po končanem sekvenčnem slikanju smo sestavili slike in pripravili krajši film, ki prikazuje dogajanje v napravi BioStation v času eksperimenta.

Slika 16 prikazuje dogajanje v napravi BioStation. Začetek sekvenčnega slikanja tkiva (A), iz katerega je razvidno, da se lasna korenina drži lasne čebulice. Po okvirno 5 dneh (B) je opaziti, da se las počasi odmika od lasne čebulice. Iz tega sklepamo, da se je prekinila faza rasti (anagen) in je prešla v fazo mirovanja (katagen). Potovanje lasu v fazi mirovanja lahko spremljamo do konca sekvenčnega slikanja v biopostaji (od C do E). Sklepamo, da so se celice dermalne papile, ki so odgovorne za uravnavanje lasnega cikla, ponovno združile v manjši skupek celic (C, Č in D), ki bi ob pravih signalih iz okolja generirale nov las.



Slika 16: Dogaianje v napravi BioStation

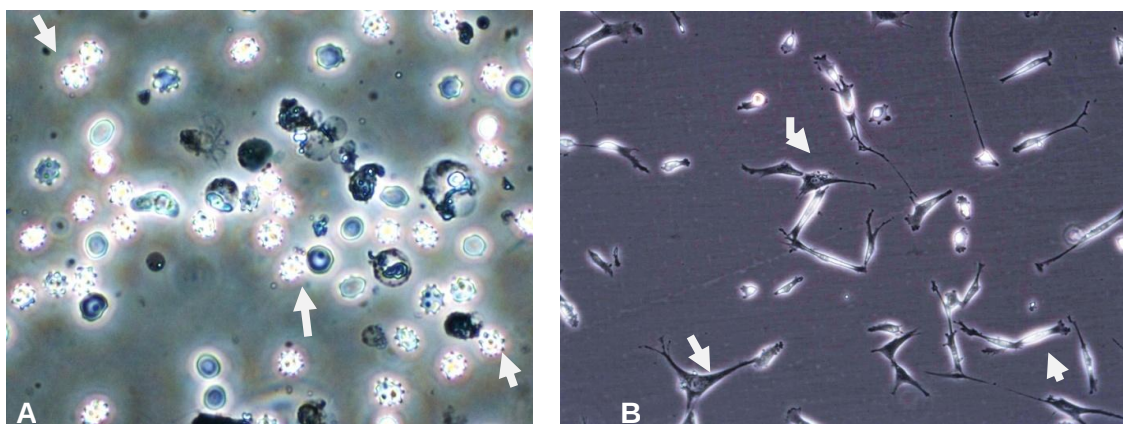
Opis: Iz fotografij je razvidno odmikanje lasnega tkiva od lasnega mešička in potovanje odmrlega lasu iz tkiva. Lasna čebulica se ponovno formulira v skupek celic, iz katerih bi ob pravih pogojih in signalih pognal nov las. Opazujemo lahko katageno fazo cikla lasu.

4.2 OPTIMIZACIJA IZOLACIJE CELIC IZ MAŠČOBE

V preteklih letih se je v raziskovanju matičnih celic kot nov vir za njihovo izolacijo začelo uporabljati tudi adipozno tkivo. V diplomski nalogi smo imeli cilj izolirati celice iz maščobnega tkiva, ki bi jih lahko uporabili pri regeneraciji lasnega mešička. V ta namen smo se najprej osredotočili na optimizacijo izolacije matičnih celic, saj sta metoda in tehnika ključnega pomena za uporabo tako v regenerativni medicini kot estetski kirurgiji, kjer imajo opraviti z majhnimi volumni. Potrebe v estetski kirurgiji, ki se nanašajo na kvalitetno pridobivanje matičnih celic iz čim manjših volumnov, so nas privedle do optimizacije celotnega procesa; torej do izbire tehnike liposukcije in dela v laboratoriju. V našem primeru smo za izkoristek maščobe, ki se je držala lasnega tkiva, predhodno potrebovali pravo izbiro protokola za izolacijo matičnih celic iz maščobnega tkiva. S tem bomo lahko v prihodnosti za izolacijo matičnih celic uporabili tudi maščobno tkivo po operaciji lasišča ali predela, kjer se nahajajo dlake.

Po prejetju maščobnega tkiva od sodelujočih kirurgov smo sledili okvirnemu protokolu za izolacijo, ki smo ga v času raziskovanja še izpopolnili. Optimizacija se nanaša na izbiro tehnike liposukcije in izolacijo celic v primernih pogojih..

V naši raziskavi nismo delali karakterizacije celic. Sodeč po znanstveni literaturi, Park in sod. 2009, smo sklepali, da so celice, ki smo jih izolirali iz maščobnega tkiva, mezenhimskim podobne matične celice, ki imajo regenerativni potencial.



Slika 17: Sveže izolirane (A) celice iz maščobnega tkiva in razrast mezenhimskih celic po gojenju (B)

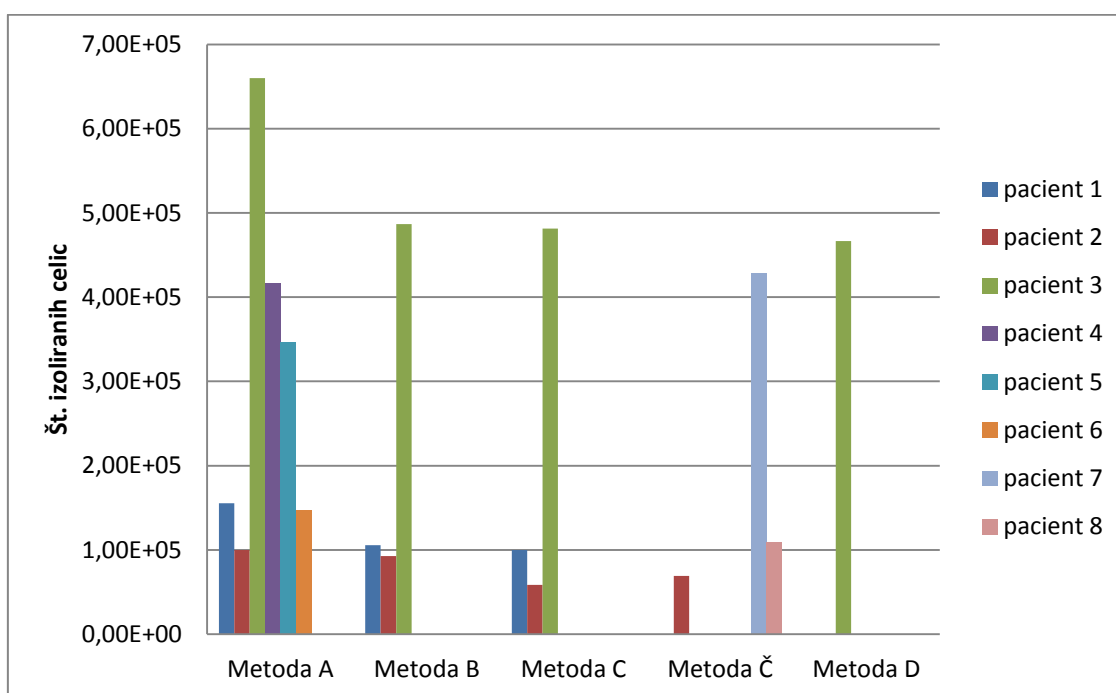
Opis: Puščice prikazujejo okrogle mezenhimske matične celice po izolaciji (A), ki v hranilnem mediju v času gojenja celic razrastejo v zvezdasto/vretenasto obliko (B).

4.3 REZULTATI IZOLACIJE CELIC

Sodeč po izsledkih neodvisnih študij, ki so pokazale, da sama liposukcija nima pomembnega vpliva na viabilnost izoliranih celic iz maščobnega tkiva (Moore in sod. 1995), smo predpostavljali, da tehnika liposukcije nima vpliva na količino in viabilnost izoliranih celic.

Kljub študijam Moore in sod. (1995) smo se odločili, da preizkusimo različne tehnike liposukcije. Tako smo prostovoljne darovalce razdelili v dve skupini. Skupina A (pacienti 1, 2, 3) in skupina B (4, 5, 6, 7 in 8). Pri skupini A je kirurg opravil več različnih tehnik liposukcije: ročna, peristaltična črpalka, odvzem z nadtlačno črpalko (0,9 bar), MicroAir in nutacijska infrasonična liposukcija. Izsledki so nas usmerili v uporabo ročne in MicroAir tehnike, ki sta pokazali najboljši potencial. Slika 18 prikazuje porazdelitev količine celic glede na metodo liposukcije.

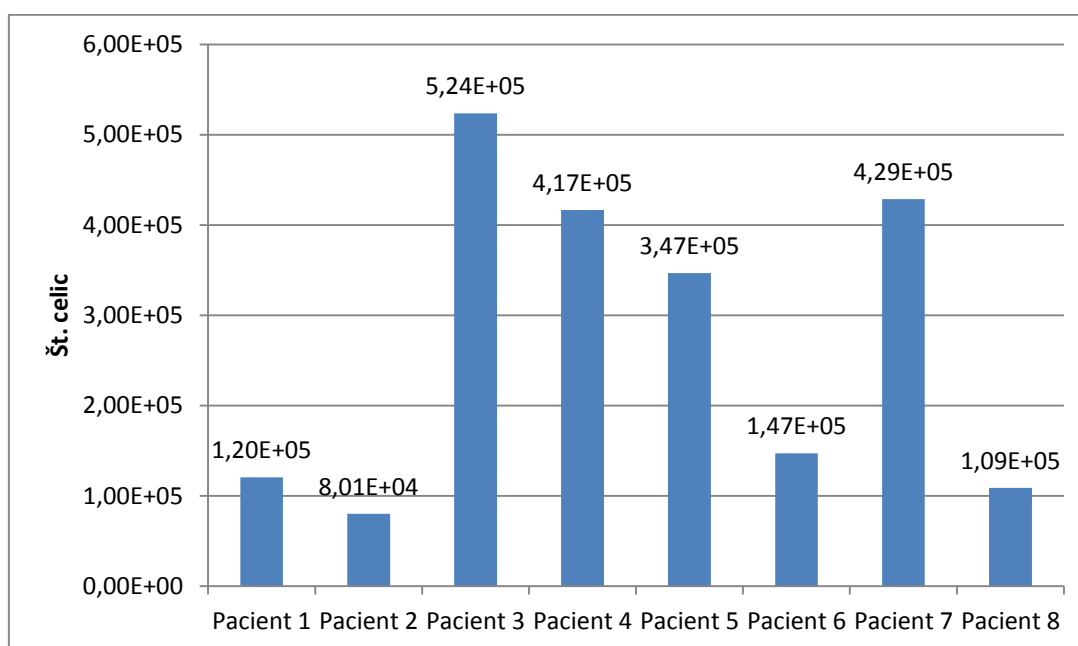
Izolacijo celic pri skupini A smo opravili v čistih (aseptičnih) prostorih klinike. Pri skupini B smo izolacijo opravili v laboratoriju podjetja Biobanka d.o.o. Dobljene rezultate smo kasneje med seboj primerjali.



Slika 18: Število izoliranih celic na 1 ml maščobe glede na tehniko liposukcije

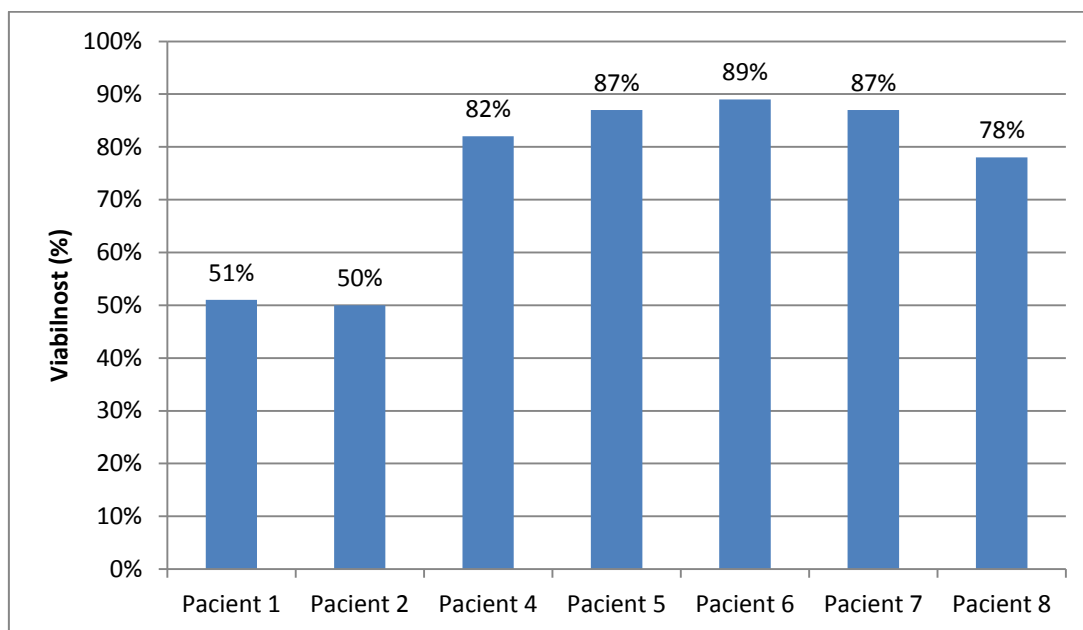
LEGENDA: ročna tehnika (metoda A), peristaltična črpalka (metoda B), odvzem z nadtlačno črpalko (0,9 bar) (metoda C), MicroAir tehnika (metoda Č) in nutacijska infrasonična liposukcija (metoda D).

Slika 19 prikazuje število izoliranih celic na 1 ml maščobe. Pri pacientih 1, 2 in 3 smo vzeli povprečne vrednosti, dobljene pri vseh metodah liposukcije. Sodeč po količini izoliranih celic se jih največ nahaja pri pacientih 3, 4, 5 in 7.



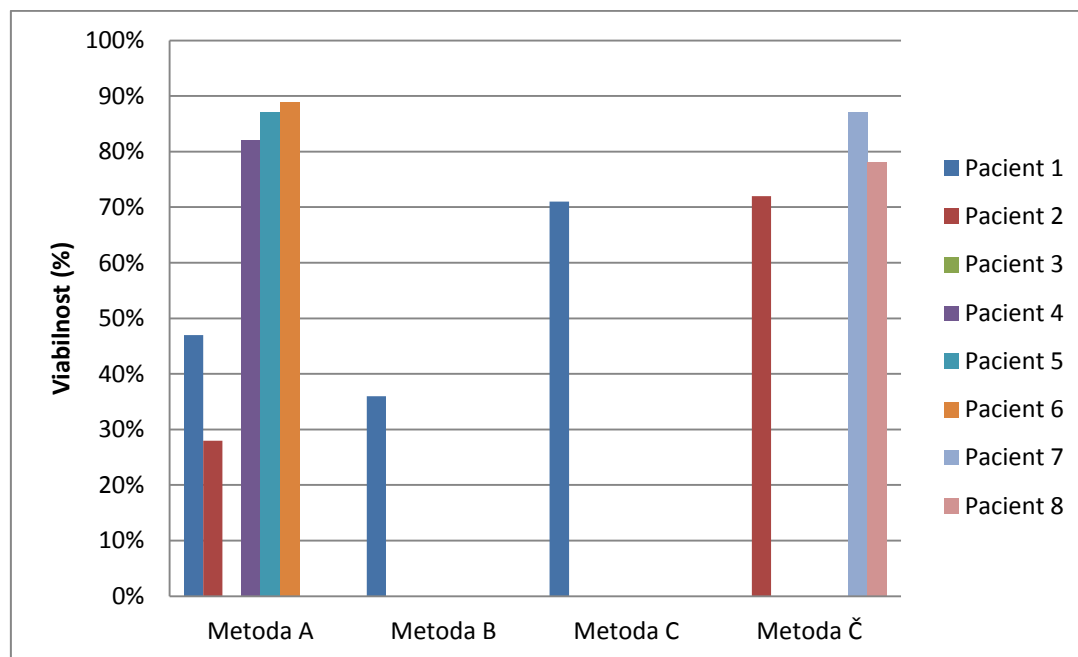
Slika 19: Število celic na 1 ml maščobe

Slika 20 prikazuje viabilnost izoliranih celic iz celokupnega volumna maščobe. Pri pacientu 3 nismo pridobili podatka o viabilnosti. Skupina A ima v primerjavi s skupino B opazno razliko v viabilnosti izoliranih celic. Povprečna viabilnost pri skupini A je 50,5 %, pri skupini B pa 84,6 %. Iz tega je razvidno, da je skupina B boljše od skupine A, saj je viabilnost celic ključnega pomena za regeneracijski potencial mezenhimskim podobnim matičnih celic. Iz podatkov je razvidno, da smo z optimizacijo uspešno izboljšali viabilnost celic, ki jih lahko uporabimo za takojšnjo uporabo, za raziskave ali dolgotrajno shranitev v tekočem dušiku oz. parah tekočega dušika.



Slika 20: Viabilnost (%) izoliranih celic iz maščobe

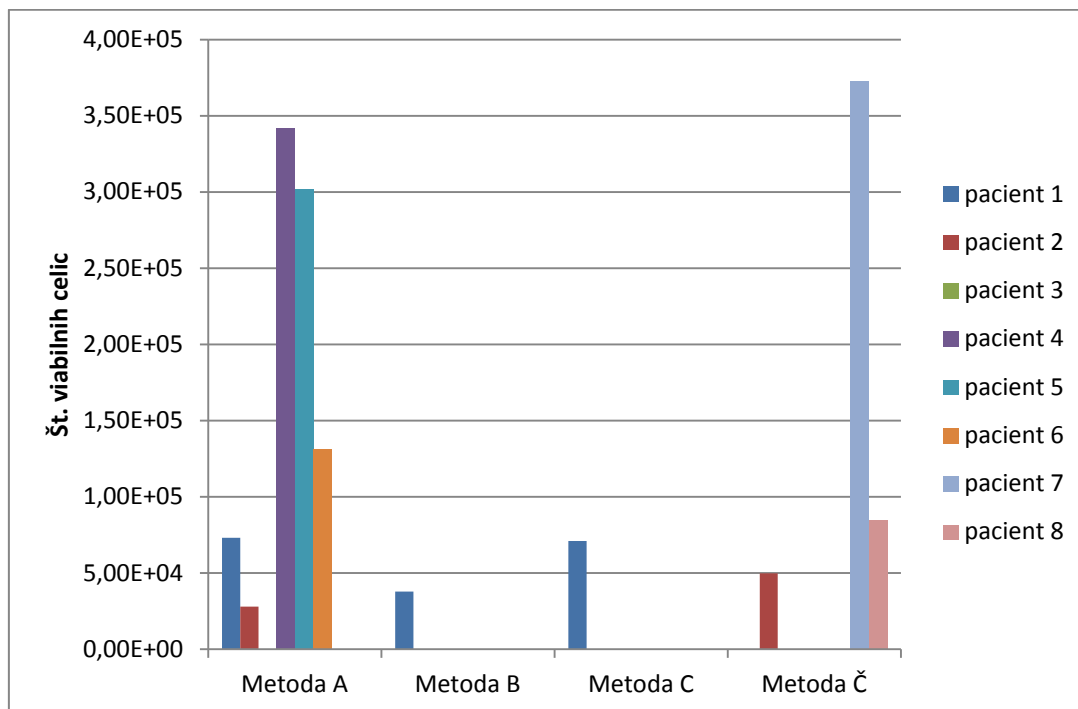
Slika 21 prikazuje viabilnost celic glede na metodo liposukcije. Iz grafa je razvidno, da sta metodi liposukcije A in Č najbolj primerni za pridobivanje maščobnega tkiva in nadaljnjo obdelavo z namenom izolacije matičnih celic.



Slika 21: Viabilnost (%) izoliranih celic glede na metodo liposukcije

LEGENDA: ročna tehnika (metoda A), peristaltična črpalka (metoda B), odvzem z nadtlačno črpalko (0,9 bar) (metoda C), MicroAir tehnika (metoda Č) in nutacijska infrasonična liposukcija (metoda D).

Slika 22 prikazuje število viabilnih celic glede na metodo liposukcije. Iz grafa lahko sklepamo, da je po številu viabilnih celic najbolj primerna metoda A.



Slika 22: Število viabilnih celic glede na metodo liposukcije

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Znanstveni del

5.1.1.1 Uporaba naprave BioStation

Naprava BioStation je naprava, ki združuje klasični inkubator za gojenje celic in svetlobni mikroskop. BioStation nam omogoča gojenje lasnega folikla in sekvenčno slikanje našega preparata v določenih časovnih intervalih. Pridobljene slike v določenih časovnih intervalih smo združili v film.

Na podlagi tako nastalega filma in literature lahko sklepamo, da je z odcepom lasnega tkiva od dermalne papile prenehala faza rasti (anagen) in las je prešel v fazo mirovanja (katagen). Po okvirno 5 dneh smo opazili, da se las počasi odmika od lasne čebulice. Opazili smo, da so se celice dermalne papile po ločitvi od lasne čebulice kasneje ponovno združile.

Soočali smo se tudi s tresljaji, ki jih je zaznala naprava BioStation. Ti so povzročili, da je tkivo spolzelo iz vidnega polja. Tresljaje je povzročalo delovanje brezprašne komore, kjer smo imeli nameščeno napravo BioStation zaradi želje po čim večji sterilnosti.

Težavo smo želeli v naslednjem poskusu odpraviti z uporabo 0,1 % želatine, saj smo predvidevali, da se bo las pritrdil na površino gojilne posodice. Rezultat uporabe želatine, kot fiksirnega medija je bil neuspešen, saj se je las že po tednu odmaknil iz vidnega polja. Zato se v nadaljnjih poskusih nismo odločili za uporabo želatine.

Pri sami izvedbi poskusa ne smemo zanemariti tudi človeškega faktorja, ki lahko povzroči dodatne tresljaje laminarija.

5.1.1.2 Potek izolacije mezenhimskim podobnih matičnih celic iz maščobe

Pri pregledu objav na tematiko izolacijo celic iz lipoaspirata smo uporabili dognanja iz naslednjih znanstvenih prispevkov: Yoshimura (2006), Garcia-Olmo (2009) in Yoshimura (2008), ki smo jih na podlagi znanja in izkušenj v podjetju Biobanka d.o.o. še nadgradili. Z dosedanjimi raziskavami smo optimizirali postopke izolacije mezenhimskim podobnih matičnih celic iz maščobnega tkiva.

Na podlagi 3 pacientov, pri katerih je kirurg uporabil različne tehnike odvzema, smo v sklopu naše raziskave obravnavali različne tehnike liposukcije. Uporabili smo naslednje tehnike: ročna, peristaltična črpalka, odvzem z nadtlačno črpalko (0,9 bar), MicroAir in nutacijska infrasonična liposukcija. Iz slike 18 so razvidne razlike v številu izoliranih celic glede na metodo liposukcije. Naši izsledki so nas usmerili v uporabo ročne metode liposukcije in MicroAir metode. Slika 22 prikazuje količino izoliranih viabilnih celic na podlagi izbora tehnike liposukcije. Zavedamo se, da bi za statistično značilne podatke potrebovali več ponovitev in razširjeno raziskavo.

V sklopu raziskave smo vseeno prišli do spoznanja, da bi bilo darovalce maščobnega tkiva najprej treba razdeliti glede na njihov spol. Pri darovalkah bi bilo treba vedeti, ali so že postale matere, saj so z materinstvom povezane določene hormonalne spremembe in s tem morebitni vplivi na strukturo maščobnega tkiva, prav tako tudi na kakovost matičnih celic. Ločeno po spolu bi darovalce morali porazdeliti tudi glede na starost, življenjski slog, zdravstveno stanje in genetske predispozicije oz. genetski profil. Za raziskovanje te hipoteze bi potrebovali več časa, večjo raziskovalno skupino in denarna sredstva, namenjena raziskavi.

Odločili smo se, da v nekaj poskusih preverimo izsledke neodvisnih študij (Moore in sod 1995). Te navajajo, da izbor tehnike liposukcije nimam pomembnega vpliva na viabilnost izoliranih celic. Glede na naše rezultate lahko sklepamo, da je tehnika liposukcije pomembna za viabilnost celic. Določene tehnike, kot npr. izolacija s

peristaltično črpalko (0,9 Bar), so precej agresivne. Vendar bi za statistično relevantne podatke potrebovali razširitev oz. poglobitev raziskave.

Na podlagi dognanj širše raziskave bi tako celoten proces pridobivanja celic iz maščobnega tkiva (spol, starost, lokacija odvzema, tehnika liposukcije in izolacija po protokolu) prilagodili posamezniku in s tem zagotovili največji donos v številu viabilnih celic, ki bi jih uporabili v »rdeči« biotehnologiji.

5.1.2 Umetniški del

K znanstvenim pristopom raziskovanja in komercializaciji odkritij lahko pripomore sodelovanje z umetniki (bioumetnost), saj doprinese k boljšemu razumevanju in tolmačenju znanosti v javnosti. Prav tako na razumljiv način predstavi znanstvena odkritja. Menim, da želja po prikazu znanosti in umetnosti lahko privede do tega, da se tako umetniki kot znanstveniki soočimo z zmožnostmi ter na realen način predstavimo koncept bioznanosti. V določeni meri nas umetnost spodbuja k razmišljanju o novih konceptih in razsežnostih že raziskanega območja, znanost pa doprinese razum v smislu realnih zmožnosti in umetnike spodbuja k razmišljanju o smislu ideje. Skupno sodelovanje obojih lahko pripelje do novih odkritij in novih spoznanj, pomembnih tako za področje umetnosti kot tudi znanosti.

Projekt *Bios in vitro* je rizomatsko strukturiran na več nivojih in spaja tehnoznanost z različnimi umetniškimi strategijami ter s humanističnim raziskovanjem tkivnega inženiringa in imunologije kot družbeno posebej aktualnih področij biotehnologije, ki obetata revolucionarne posledice še zlasti v medicini in estetski kirurgiji, ter refleksijo o hibridizaciji umetnosti, humanistike in tehnoznanosti, ki je v zadnjih letih v vzponu.

Avtorsko-izvajalska² skupina je na različnih segmentih osredotočena na raziskovalni proces in spajanje področij ob usklajevanju heterogenih interesov. Pri tem delovanje ni usmerjeno v proizvodjanje zaključenih proizvodov, artefaktov, namenjenih kontemplaciji, temveč v odpiranje raziskovalnega procesa in celotnega diskurza priložnostni javnosti. Namen projekta je komuniciranje biotehnoloških možnosti s širšo javnostjo, uresničevanje specifičnih ciljev, ki so zanimivi tako z biotehnološkega kot kiparskega in drugih aspektov, ter odpiranje povezanih vprašanj, ki so izrednega pomena za sodobnega posameznika in družbo.

Humanistično-naravoslovni projekt *Bios in vitro* je sestavljen iz treh dopolnjujočih se delov, in sicer tehnološkega, humanističnega ter umetniškega dela. Njegov namen je predstaviti znanstvenobiološki projekt širši javnosti na popolnoma nov, izviren način, saj menimo, da je pri nas kot tudi drugod po svetu tehnološka izvedba mnogokrat skrita pred očmi javnosti. S projektom smo prikazali kompleksne in večplastne humanistične razsežnosti pričujoče tematike. Omeniti je treba, da se bo projekt *Bios in vitro* (*Las in vitro* in *Iniciacija*) predstavil še na prihajajočih festivalih,.

Projekt predstavlja določen pristop k biotehnološkim praksam, saj nam razvoj biotehnologije ponuja številne nove možnosti, a hkrati prinaša celo vrsto daljnosežnih sprememb, ki zadevajo sodobno družbo, kulturo in posameznika. Umetnost v tem primeru nastopa kot transdisciplinarno polje, znotraj katerega je mogoče uporabljati znanstvene metode, tehnike, postopke in orodja, kot je znotraj polja umetnosti možno izvajati diskurz o biotehnologiji in na različne načine osvetljevati problematiko ter odpirati vprašanja, ki lahko v tem primeru dosežejo tudi širšo in ne le strokovne javnosti.

² Koncept, vodenje, vizualizacija: Polona Tratnik; Biotehnološko raziskovanje: Miomir Knežević, Primož Rožman, Ajda Marič, Živa Marinko; Plastična kirurgija: Aleš Leskovšek; Fotografija: Damjan Švarc; Film: Robi Černelč, Jože Baša & ArtLAB; Oblikovanje: Miha Turšič; Humanistika: Miško Šuvaković et al.; Producent: Horizonti, zavod za umetnost, kulturo, znanost in izobraževanje; So-producenta: Zavod za transfuzijsko medicino Slovenije; Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče Koper; Podpora projekta: Ministrstvo za kulturo RS, ARRS, SIMED Zdravstvo d. o. o. Posebne zahvale: Matija Veber, Nevenka Kregar Velikonja & Educell d. o. o., Božo Jernejčič & Tehnooptika Smolnikar d. o. o., Galerija Kapelica, Moderna galerija Ljubljana in Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta.

5.2 SKLEPI

Na podlagi raziskovalnega dela lahko podamo naslednje sklepe:

- Delovne hipoteze, da matične celice iz lasnega mešička vplivajo na rast lasu v pogojih *in vitro*, pri tem pa jim pomagajo tudi matične celice iz maščobnega tkiva, nismo potrdili, saj bi potrebovali več časa, večjo raziskovalno skupino in denarna sredstva, namenjena raziskavi.
- Dokazali smo, da lasu ni mogoče vzdrževati v vitalnem stanju neomejeno dolgo. Iz literature lahko sklepamo, da se je z odcepom lasnega tkiva od dermalne papile prenehala faza rasti (anagen) in je las prešel v fazo mirovanja (katagen). Opazili smo, da so se celice dermalne papile po ločitvi od lasne čebulice kasneje ponovno združile. S tem smo ovrgli našo delovno hipotezo.
- Pri uporabi naprave BioStation bi lahko uporabili ploščo stiroporja, s katero bi omilili tresljaje laminarija.
- Za namene uporabe matičnih celic iz lasnega mešička, ki bi bile namenjene za vzgojitev novega lasnega mešička, bi bilo treba dodatno raziskovanje na tem področju, s tem pa povezana denarna sredstva in ustrezno kvalificirani človeški viri.
- V želji po personaliziranem pristopu k zdravljenju bolezni, ki jih lahko zdravimo z uporabo matičnih celic iz maščobe (npr. kronično obolenje tkiva), bi potrebovali poglobljeno raziskavo. Darovalce maščobnega tkiva bi najprej razdelili glede na spol. Pri darovalkah bi bilo treba vedeti, ali so že postale matere, saj so z materinstvom povezane določene hormonalne spremembe, ki vplivajo na strukturo maščobnega tkiva, prav tako pa tudi na kakovost matičnih celic. Tako ločene po spolu bi darovalce morali razdeliti tudi glede na starost, življenjski slog, zdravstveno stanje in genetske predispozicije oz. genetski profil. Ob tem bi spremljali še lokacijo odvzema maščobnega tkiva.
- Zaradi same kakovosti matičnih celic iz maščobe za namene operativnih posegov ali zdravljenja je treba izbrati optimalno lokacijo za odvzem maščobnega tkiva.

- Pomembno je, da metoda odvzema ne poškoduje celic, saj lahko s tem izkoristimo celoten potencial izoliranih matičnih celic.
- Prek sodelovanja znanstvenikov z umetniki se poveča komunikacija biotehnoloških možnosti s širšo javnostjo. Na ta način se uresničujejo specifični cilji, ki so zanimivi tako z biotehnološkega kot z umetniškega stališča ter z drugih aspektov. Ob tem se odpirajo povezana vprašanja, ki so izrednega pomena za sodobnega posameznika in družbo.

6 POVZETEK

V sklopu diplomske naloge smo želeli raziskati, ali matične celice vplivajo na rast lasu, a zaradi pomanjkanja denarnih in človeških virov tega dela nismo uspeli izpeljati. Tako smo se osredotočili na celotno optimizacijo postopka pridobivanja maščobnega tkiva in celic iz maščobe in predstavitev projekta v sklopu sodobne umetnosti oz. bioumetnosti pod imenom *Bios in vitro*, ki se je v kasnejši fazi razvil v *Las in vitro* in *Iniciacijo*, ter na ta način komunicirali z javnostjo in jim približali znanost.

Po prejemu lasnih vzorcev smo v brezprašni komori pod lupo najprej secirali tkivo in na ta način osamili lasne mešičke ter lasne korenine od odvečnega okoliškega tkiva. Pri tem smo pazili, da smo s tkivom ravnali nežno, saj stres pomeni zaključek lasnega cikla, ker so lasje zelo občutljivi. Izolirane lase smo nato dvakrat spirali v pripravljeni raztopini za čiščenje in jih dali v hranilni medij oz. gojišče. Z zmožnostmi, ki so nam bila na voljo smo v pogojih *in vitro*, in s pomočjo naprave BioStation smo opazovali lasni cikel, ki je preko začetne faze, torej faze anagen, prišel v fazo katagen in kasneje v fazo telogen. BioStation omogoča intervalno sekvenčno slikanje vzorca. Po končanem procesu smo sestavili slike in pripravili krajši film, ki prikazuje dogajanje v napravi BioStation v času eksperimenta. Naša predpostavka je bila, da so za faze odgovorni signali, s katerimi so povezane tudi matične celice, ki se nahajajo v neposredni bližini lasnega mešička oz. obdajajo las kot tkivo. Da bi potrdili našo predpostavko, bi morali nadaljevati študijo, kar zahteva dodatno laboratorijsko opremo in v ta namen izučeno laboratorijsko osebje. V okviru naše raziskave smo dokazali, da las lahko »ohranimo pri življenju« vsaj 3 tedne. V primeru, da bi želeli generirati nov folikel, bi potrebovali ustrezne signale iz okolja (npr. protein WNT).

V diplomski nalogi smo se ambiciozno odločili uporabiti matične celice iz adipoznega tkiva kot vir za uporabo pri regeneraciji lasnega mešička in posledično pri aktivaciji lasnega cikla. V ta namen smo se najprej osredotočili na optimizacijo celotnega postopka osamitve celic. Potrebe v estetski kirurgiji, ki se nanašajo na kakovostno pridobivanje matičnih celic iz čim manjših volumnov, so nas privedle do optimizacije

celotnega procesa, torej do izbire tehnike liposukcije in dela v laboratoriju. V našem primeru smo za izkoristek maščobe, ki se je držala lasnega tkiva, predhodno potrebovali pravo izbiro protokola za izolacijo matičnih celic iz maščobnega tkiva. S tem bomo lahko v prihodnosti za izolacijo matičnih celic uporabili tudi maščobno tkivo po operaciji lasišča ali predela, kjer se nahajajo dlake.

Med uporabljenimi tehnikami liposukcije (ročna, peristaltična črpalka, odvzem z nadtlačno črpalko (0,9 bar), MicroAir in nutacijska infrasonična liposukcija) smo izbrali najprimernejši tehniki – ročno in MicroAir. Optimizirali smo izolacijo matičnih celic iz maščobe za namene preučevanja podporne plasti za rast lasnega mešička ter znanje ekstrapolirali na estetsko in regenerativno medicino. Da bi pridobili bolj natančne in statistično signifikantne podatke, bi se morali nadaljnjih raziskav na tem področju lotiti bolj sistemsko.

V sklopu raziskave smo prišli do spoznanja, da bi darovalce maščobnega tkiva najprej razdelili glede na njihov spol. Pri darovalkah bi bilo treba vedeti, ali so že postale matere, saj so z materinstvom povezane določene hormonalne spremembe in s tem morebitni vplivi na strukturo maščobnega tkiva, prav tako pa tudi na kakovost matičnih celic. Ločeno po spolu bi darovalce morali porazdeliti tudi glede na starost, življenjski slog, zdravstveno stanje in genetske predispozicije oz. genetski profil. Za raziskovanje te hipoteze bi potrebovali več časa, večjo raziskovalno skupino in finance, namenjene raziskavi.

Za štetje celic smo uporabili 3 metode, in sicer: štetje z aparatom COUNTESS (Invitrogen), štetje s hematološkim analizatorjem (Beckman coulter Act Diff 2) ter štetje s hemocitometrom. Za potrebe naših analiz, tj. števila celic, smo zanemarili tehniko izolacije, saj smo predpostavljali, da nima določene teže pri samem končnem številu.

K znanstvenim pristopom raziskovanja in komercializaciji odkritij lahko pripomore sodelovanje z umetniki (bioumetnost), saj doprinese boljše razumevanje in tolmačenje znanosti v javnosti. Prav tako na razumljiv način predstavi znanstvena odkritja. V sklopu predstavitve projekta pod imenom *Bios in vitro*, ki se razdeli na *Las in vitro*

(ang. *Hair in vitro*) in *Iniciacija* (ang. *Initiation*) smo sodelovali na različnih festivalih, npr. *Evropska prestolnica kulture* (*Soft control, NanoUmetnosti*), okroglih mizah, na filmskem festivalu *Bio:Fiction: Synthetic Biology Science, Art, and Film Festival* na Dunaju ipd. V sklopu projekta sta izšli tudi publikaciji *Surplus LIFE: The Philosophy of Contemporary Transitional Art and Form of Life; With Regards to the Artistic Productions of Polona Tratnik* (avtor Miško Šuvaković) in *In vitro živo onstran umetnosti in telesa* (avtorica Polona Tratnik). Več o odmevnosti projekta je razvidno iz Priloge B.

7 VIRI

Anatomski atlas in človeško telo. 2004. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 200 str.

Art&Science: creative fusion. 2008. European Commission, Directorate-General for Research. Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities: 30 str.

Barry F.P. in Murphy J.M. 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36: 568—584

Barsh G.S. 2003. What controls variation in human skin color? PLoS Biology, 1: 19—22

BioStation IM-Q. 2012. Japonska, Nikon Corporation: 11 str.
<http://www.nikon.com/products/instruments/lineup/bioscience/time/imq/index.htm>
(februar 2013)

BioStation IM cell. 2009. Japonska, Nikon Corporation: 1 str.
http://www.nikoninstruments.com/images/stories/PDFs/Biostation_IM_data_sheet.pdf
(februar 2013)

Blume-Peytavi U., Hillmann K., Guarrera M. 2008. Hair growth assessment techniques. V: Hair growth and disorders. Whiting D.A., Trüeb R.M. (eds.). Leipzig, Springer: 125—157

Človeško telo. 1985. Ljubljana, Mladinska knjiga: 199 str.

- Festa E., Fretz J., Berry R., Schmidt B., Rodeheffer M., Horowitz M., Horsley V. 2011. Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell*, 146, 5: 761—771
- Fuchs E., Merrill B.J., Jamora C., DasGupta R. 2001. At the roots of a never-ending cycle. *Developmental Cell*, 1: 13—25
- Gafer-Gvili A., Sredni B., Gal R., Gafer U., Kalechman Y. 2003. Cyclosporin A-induced hair growth in mice is associated with inhibition of calcineurin-dependent activation of NFAT in follicular keratinocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 284: 1593—1603
- Garcia-Olmo D., Herreros D., Pascual I., Pascual J.A., Del-Valle E., Zorrilla J., De-La-Quintana P., Garcia-Arranz M., Pascual M. 2009. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Diseases of Colon and Rectum*, 52, 1:79—86
- Godić A. 2009. Bolezni lasišča in dlak. V: *Kožne in spolne bolezni*. 2. Dopolnjena izd. Ljubljana, Združenje slovenskih dermatovenerologov: str. 305—314
- Griffiths A.J.F., Wessler R.S., Lewontin R.C., Carroll S.B. 2008. *Introduction to genetic analysis*. 9th ed., New York, W.H. Freeman: 838 str.
- Hagman A. 1998. *Kozmetika: teorija, nega in ličenje*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 182 str.
- Huster A., Kortekamp H., Tewes B., Wanzek J., Wiggelinghoff B. 1998. *Frizerstvo*. 1 izd. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 256 str.
- Jablonski N.G., Chaplin G. 2000. The evolution of human skin coloration. *Journal of Human Evolution*, 39: 57—106

- Juzeniene A., Setlow R., Porojnicu A., Steindal A.H., Moan J. 2009. Development of different human skin colors: A review highlighting photobiological and photobiophysical aspects. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96: 93—100
- Karničar K. 2007. Genetska tipizacija las v telogenski fazi s preiskavo skrajšanih lokusov STR. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije: 87 str.
- Kocjančič M. 1993. XIV. Bolezni lojnic, znojnic, las in nohtov. V: *Mala dermatovenerologija: z atlasom kožnih in spolno prenosljivih bolezni: priročnik za zdravnike in študente*. 3. izd. Ljubljana, Mihelač: 201—215
- Lanbein K., Skalnik C. 2007. Izpadanje las. V: *Veliki zdravstveni vodnik: kaj resnično pomaga. Bolezni in terapije od In do Me*. Kržišnik M. (ur.). Kranj, Modita: 197—198
- Li L., Clevers H. 2010. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*, 327: 542—545
- Majdič J. 2004. Preiskave las. V: *Kriminalistika: uvod, taktika, tehnika*. Maver D. (ur.). Ljubljana, Uradni list Republike Slovenije: 477—486
- Marinko Ž. 2010. Las *in vitro*. Diplomski seminar. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije: 30 str.
- Moore J.H.Jr., Kolaczynski J.W., Morales L.M., Considine R.V., Pietrzkowski Z., Noto P.F., Caro J.F. 1995. Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: effects of local anesthesia with lidocaine. *Aesthetic Plastic Surgery*, 19: 335—339
- Morioka K. 2005. Hair follicle: Differentiation under the electron microscope. Tokio, Springer: 150 str.

- Panfilov I.A., de Jong R., Takashima S., Duckers H.J. 2013. Clinical study using adipose-derived mesenchymal-like stem cells in acute myocardial infarction and heart failure. *Methods in Molecular Biology*, 1036: 207—212
- Parakkal P.F. 1979. Katagen- und Telogenphase. V: *Haar und Haarkrankheiten*. Orfanos C.E. (ed). Stuttgart, Fischer: str. 77—93
- Park B.S., Kim W.S., Choi J.S., Kim H.K., Won J.H., Ohkubo F., Fukuoka H. 2010. Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. *Biomedical Research*, 31, 1: 27—34
- Paus F., Cotsarelis G. 1999. Mechanisms of disease: the biology of hair follicles. *The New England Journal of Medicine*, 341, 7: 491—497
- Peus D., Pittelkow M. 1996. Growth factors in hair organ development and the hair growth cycle. *Dermatologic Clinics*, 14, 4: 559—572
- Philpott M., Green M. R., Kealey T. 1989. Studies on the biochemistry and morphology of freshly isolated and maintained rat hair follicles. *Journal of Cell Science*, 93: 409—418
- Randall V.A., Botchkareva N.V. 2009. The biology of hair growth. V: *Cosmetic applications of laser and light-based systems*. Norwich, William Andrew Inc.: 3—35
- Rook A. 1965. Endocrine Influences on Hair Growth. *British Medical Journal*, 1: 609—614
- Schmidt B. in Horsley V. 2012. Unravelling hair follicle-adipocyte communication. *Experimental Dermatology*, 21, 11: 827—30

Seeley R.R., Stephens T.D., Tate P. 1995. Chapter 5: integumentary system. V: Anatomy & physiology. 3rd ed. St. Louis, Mosby: 143—162

Stenn K.S. in Cotsarelis G. 2005. Bioengineering the hair follicle: fringe benefits of stem cell technology. Current Opinion in Biotechnology, 16:1—5

Štiblar Martinčič D. 2008. Koža in njeni derivati. V: Anatomija, histologija, fiziologija. 2. izd. Štiblar Martinčič D. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta: 23—29

Toyoshima K., Asakawa K., Ishibashi N., Toki H., Ogawa M., Hasegawa T., Irié T., Tachikawa T., Sato A., Takeda A. in Tsuji T. 2012. Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches. Nature Communications, 3: 784
DOI: 10.1038/ncomms1784

Tratnik P. 2010. V: In vitro: živo onstran telesa in umetnosti. Ljubljana, Horizonti, zavod za umetnost, kulturo, znanost in izobraževanje: 185 str.

Voog J., Jones D.L. 2010. Stem cells and the niche: a dynamic duo. Cell Stem Cell, 6, 103 – 115

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 Cell Physiology, 208, 1: 64—76

Yoshimura K., Sato K., Aoi N., Kurita M., Hirohi T., Harii K.. 2008. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. Aesthetic Plastic Surgery, 32, 1: 48—55

Yuen A.W.C., Jablonski N.G. 2010. Vitamin D: in the evolution of human skin colour. Medical Hypotheses, 74: 39—44

Wheeler P.E. 1996. The environmental context of functional body hair loss in hominids (a reply to Amaral, 1996). *Journal of Human Evolution*, 30: 367—371

Zorc M. 2012. Koža (Cutis). V: *Histologija: učbenik*. Petrovič P., Zorc M. (ur.). Ljubljana, Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta: 115—123

Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P. in Hedrick M.H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7, 2: 211—228

Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P. in Hedrick M.H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 12: 4279—4295

Zviak C., Dawber R.P.R. 1986. Hair structure, function and physicochemical properties. V: *The science of hair care*. Zviak C. (ed.). New York, Marcel Dekker Inc.: 1—44

ZAHVALA

Po 4 letih delovanja na projektu *Bios in vitro* je istoimenska diplomska naloga zaključena. Na poti od začetka do konca smo bili del pozitivne selekcije, saj smo se soočili z različnimi izzivi, ki so nas samo utrdili.

Na tem mestu bi se rada zahvalila mentorju doc. dr. Miomirju Kneževiću, ki je v 3. letniku navdušeno sprejel mojo idejo o povezovanju znanosti in umetnosti ter me seznanil s doc. dr. Polono Tratnik, ki je pionirka bioumetnosti v Sloveniji in me je popeljala v neznani svet umetnosti oz. bioumetnikov.

Recenzentu izr. prof. dr. Primož Rožman, dr. med., spec. transf. med. za recenzuro in usmerjanje za čas mojega dela na Zavodu za transfuzijsko medicino RS.

Zahvala za tehnološki del gre predvsem mojemu laboratorijskemu mentorju dr. Marku Strbadu, ki mi je nudil oporo pri težavah, s katerimi smo se soočili, in Matiji Vebru, ki mi je pomagal z BioStation. Zahvaljujem se tudi Živi Marinko, s katero sva začetne ure na projektu preživeli skupaj in raziskovali nama neznano področje, in dr. Mojci Jež za pomoč pri izpeljavi zadnje faze diplomske naloge.

Doc. dr. Poloni Jamnik se zahvaljujem za nasvete glede priprave dokumentacije za študijsko komisijo.

Zahvala gre tudi ekipi, ki je poskrbela za tehnično obdelavo in vizualizacijo gradiva v sklopu projekta: Damjan Švarc, Miha Turšič, mag. Robert Černelč in Jože Baša.

Zahvaljujem se tudi prijateljem in sošolcem za čudovita ter nepozabna študentska leta. Prav tako hvala za vse vzpodbudne besede in pomoč Živi Ramšak, Nataši Hojnik, Eriki Prašnikar in Ani Cerar, ko sem naletela na oviro pri diplomski nalogi.

Zahvaljujem se tudi ekipama ŠOBF 2008—2010 in 2010—2012, ki sta mi popestrili študentske dni in me popeljali v svet študentskega organiziranja. Zahvala gre tudi Damjanu Vinku, Tadeji Žohar in Andreju Kraševcu, ki so me popeljali v svet študentskega organiziranja.

Na koncu bi se rada zahvalila še svoji družini, ki je spremljala različne predstavitve projekta po Sloveniji. Še posebno sestri Sarah, ki me je zmeraj znala razbremeniti in z veseljem spremljala razvoj projekta, ter mami, ki sem jo včasih šokirala z razsežnostjo diplomske naloge, za trenutke, ko mi je prisluhnila, in za vso podporo v času študija.

Sposoben krmar pluje tudi z raztrganimi jadri. (slovenski pregovor)

PRILOGE

Priloga A: Dokumentacija za etično komisijo RS

KOMISIJA R SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO Akad. prof. dr. Jože Trontelj, dr. med., predsednik Inštitut za klinično nevrofiziologijo, Klinični center Ljubljana, Zaloška c. 7, 1525 Ljubljana,		Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino Blood Transfusion Centre of Slovenia
		Strokovni direktor Izr.prof.dr.Primož Rožman, dr. med.
	Ljubljana, 26.05.2010	
ZADEVA: Vloga za presojo etičnosti – znanstveno-humanističnega- umetniškega projekta		Tel.: +386 (0)1 543-81-61
Spoštovani g. akad. prof. dr. Jože Trontelj, dr. med.!		
Prosim za odobritev razširitve načrta že odobrene raziskave »Uporaba humane matične celice za zdravljenje«, za katero je KME že izdala svoje soglasje (210/03/08; datum obravnave dne 18.03.2008; datum dopisa 7.4.2008). Razširitev se nanaša na znanstveno raziskavo v okviru humanistično-umetniškega projekta z naslovom "Bios <i>in vitro</i> ".		
Vodja projekta je doc.dr. Polona Tratnik (Univerza na Primorskem), ki kot pobudnica in idejni vodja skrbi za nemoten potek umetniškega dela. Ideja projekta izhaja iz že zastavljenega umetniškega dela doc. dr. Polone Tratnik in tehnološkega dela doc. dr. Miomirja Kneževiča, ki sta že leta 2005 predstavila projekt »Lasje«.		
Medicinski del projekta bo raziskava o matičnih celicah v lasnem mešičku in rasti las v osamljenem lasnem mešičku <i>in vitro</i> , ki se bo izvajala kot dodatek zgoraj omenjenega programa.		
Zahvaljujem se Vam za Vaš odgovor.		
S spoštovanjem,		
Izr. prof. dr. Primož Rožman, dr. med.		
Priloge:		
1. Kratka predstavitev projekta 2. Potek raziskovalnega dela projekta 3. Humanistično umetniški del 4. Izjava o poučenosti in zavestni in svobodni privolitvi preiskovanca/ke 5. Izjava raziskovalca, da bo spoštoval načela helsinško-tokijske deklaracije, kodeksa etike zdravstvenih delavcev Slovenije in druga etična načela, izjava o konfliktu interesov. 6. Povzetek raziskave v jeziku, ki je razumljiv osebam brez medicinske izobrazbe		
   WHO Collaborating Centre		Štajmerjeva ulica 6 1000 Ljubljana Slovenija Tel.: +386 (0)1 543-81-01 Fax: +386 (0)1 230-22-24 central@ztm.si www.ztm.si



KOMISIJA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO

Prof. dr. Primož Rožman, dr. med.
Zavod RS za transfuzijsko medicino
Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

Štev.: 122/06/10
Datum: 27. 7. 2010

Spoštovani gospod profesor,

Komisiji za medicinsko etiko (KME) ste 26. 5. 2010 poslali nov dokument v zvezi z raziskavo z naslovom:

"Bios in vitro." KME 210/03/08, 164/02/09.

Gre za prošnjo za razširitev že odobrene raziskave z raziskovalnim programom P3-0371 *"Uporaba humane matične celice za zdravljenje."* Opredeljujete jo kot "humanistično-umetniški projekt". Vodji bosta doc. dr. Polona Tratnik za umetniški del in doc. dr. Miomir Knežević za tehnološki del. Prikazali naj bi gojenje človeških las in vitro iz matičnih celic.

KME je na seji 8. 6. 2010 menila, da je prikazovanje rab medicinskih tehnologij na bolnikih ali delih človeških teles v *umetniške namene* lahko etično vprašljivo. Če bi celoten projekt namenili le umetnosti, bi se etična sprejemljivost celo zožila. Če pa gre bolj za nekakšen »stranski produkt«, ko glavni nameni ostajajo znanost, medicina ali izobraževanje (tudi laične javnosti), se sprejemljivost poveča. Podobno velja, če se bo v umetniški namen kazala le mikroskopska slika ali neprepoznavni detajli konkretnih teles, katerih identitete ni mogoče ugotoviti.

Vljudno prosimo za malo širšo razlago Vaših načrtov.

S spoštovanjem in lepimi pozdravi,

V imenu Komisije za medicinsko etiko:
prof. dr. Jože Trontelj



Zavod Republike Slovenije
za transfuzijsko medicino
Blood Transfusion Centre of Slovenia

KOMISIJA R SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO

Akad. prof. dr. Jože Trontelj, dr. med., predsednik

Inštitut za klinično nevrofiziologijo,

Klinični center Ljubljana,

Zaloška c. 7, 1525 Ljubljana,

Ljubljana, 12.08.2010

Strokovni direktor

Izr. prof. dr. Primož Rožman, dr. me

Tel.: +386 (0)1 543-81-61

Fax: +386 (0)1 230-22-24

primoz.rozman@zrm.si

ZADEVA: Vaš dopis 122/06/10 - Dopolnitev vloge za presojo etičnosti – znanstveno-humanističnega-umetniškega projekta

Spoštovani g. akad. prof. dr. Jože Trontelj, dr. med.!

Hvala za vaš dopis št. 122/06/10, v katerem nas pozivate, da naj širše razložimo ozadje vloge za odobritev raziskovalne naloge *Bios in vitro*, ki bo tudi diplomska naloga študentke biotehnologije Ajde Marič. Kot že omenjeno, je njena naloga del že odobreno raziskave »Uporaba humane matične celice za zdravljenje«, za katero je KME že izdala svoje soglasje (210/03/08; datum obravnave dne 18.03.2008; datum dopisa 7.4.2008). Nanaša se na identifikacijo matičnih celic v neposredni okolici lasnega mešička in morebitnem vplivu matičnih celic na rast lasu oz. dlake. Celoten projekt originalno ni namenjen umetnosti, temveč znanosti - biomedicini. Kot stranski produkt se odpira tudi možnost predstavitve projekta širši javnosti in s tem seznanjanja ljudi s procesom eksperimentalnega dela raziskovalcev. Ta del je predmet umetniške predstavitve, ki jo vodi doc.dr. Polona Tratnik, s katero smo sodelovali tudi pri nekaterih njenih prejšnjih projektih. V umetniški namen se bodo kazali izključno neprepoznavni detajli človeškega telesa in mikroskopske slike kultur *in vitro*, katerih identiteta bo seveda nerazpoznavna. Tkivo v raziskavi bodo darovali prostovoljci, ki bodo dali ustrezno soglasje (priloženo že v prvem dopisu). Mnenja smo, da so takšni informativni projekti pomembni, saj s tem omogočamo javnosti objektivni vpogled v raziskovalno delo. Prilagam Vam tudi spremno besedo Janeza Potočnika, evropskega komisarja za znanost in raziskave, v reviji Art&Science, ki govori o smiselnosti takih projektov.

Zahvaljujem se Vam za Vaš odgovor.

S spoštovanjem,

Izr. prof. dr. Primož Rožman, dr. med.

Priloge:

1. Spremna beseda Janeza Potočnika v reviji Art&Science Creative Fusion, 2008
2. Predstavitev umetniškega konteksta projekta *Bios in vitro*
3. Življenjepis doc.dr. Polone Tratnik
4. Članek: BridA/ T. Kerševan, S. Mango, J. Pavlica, 2009 Nekje med umetnostjo in znanostjo, *Journal of Science Communication* 8(2)
5. Članek: P. Tratnik, 2008, (Bio)umetnost in manipuliranje z živim, *Annales: Series Historia et Sociologia* 18
6. Kopija prve prijave s prilogami

Štajmerjeva ulica 6
1000 Ljubljana
Slovenija
Tel.: +386 (0)1 543-81-00
Fax: +386 (0)1 230-22-24
central@zrm.si
www.zrm.si





KOMISIJA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO

Izr. prof. dr. Primož Rožman, dr. med.
Zavod RS za transfuzijsko medicino
Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

Štev.: 108/08/10
Datum: 26. 8. 2010

Spoštovani gospod prof. dr. Rožman,

Komisiji za medicinsko etiko (KME) ste 12. 8. 2010 poslali Vaš odgovor na pomisleke KME k predlogu raziskave z naslovom:

"*Bios in vitro*." Prošnja za razširitev že odobrene raziskave z raziskovalnim programom P3-0371 "*Uporaba humane matične celice za zdravljenje*." KME 210/03/08, 164/02/09. Humanistično-umetniški projekt, vodja doc. dr. Polona Tratnik za umetniški del, in doc. dr. Miomir Knežević za tehnološki del. KME 122/06/10.

KME je na seji 17. avgusta 2010 sprejela Vaša pojasnila in Vam s tem izdaja svoje soglasje.

S spoštovanjem in lepimi pozdravi,

prof. dr. Jože Trontelj
predsednik Komisije za medicinsko etiko

Priloga B: Odmevnost projekta *Bios in vitro* oz. *Las in vitro* in *Iniciacija*

2012

ARSCOPE, Kunsthochschule für Medien (KHM), Köln (19. in 20. 12.).

Soft Control: *Art, Science, and Technologically Unconscious*, Maribor: Evropska pestolnica kulture (EPK). Kustos: Dmitry Bulatov, projekt *Initiation*, (od 19. 11. do 15. 12.).

ASYMMETRIC EUROPE, Muzej savremene umetnosti Vojvodine, Novi Sad (od 16. 11. do 2. 12. 2012). Projekt *Las in vitro* (*Hair in vitro*).

Life Affairs / Aféry života, BIOART show, DIG gallery, Strojársená 3, Košice, Slovaška (od 18. 10. do 18. 11.).

Nano umetnosti, EPK, *Las in vitro*, Kulturni inkubator, Koroška cesta 18 v Mariboru, kustos: Jože Slaček, (20. 7. 2012). Projekt *Las in vitro*.

2011

12 mm (*Operation, Hair in vitro, Laboratory*) in predavanje Miška Šuvakovića. Predstavitev knjige *Surplus LIFE: The Philosophy of Contemporary Transitional Art and Form of Life; With Regards to the Artistic Productions of Polona Tratnik* (koncept: Miško Šuvaković, fotografija Damjan Švarc); diskusija o projektu: Miško Šuvaković, Miomir Knežević, Mojca Puncer in Ajda Marič. Horizonti in galerija Kapelica (9. 12.).

SZENARIEN ÜBER EUROPA. SZENARIO 1, GALERIE FÜR ZEITGENÖSSISCHE KUNST LEIPZIG, kustos: Miško Šuvaković et al. (od 10. 9. do 13. 11.).

Bio:Fiction: Synthetic Biology Science, Art, and Film Festival, Dunaj (od 13. 5. do 14. 5.).

2010

SEAFair 2010 The Apparatus of Life and Death, kustos: Melentie Pandilovski, Skopje, Makedonija (od 4. 10. do 20. 10.).

Kiparstvo danes. Komponente, stičišča in presečišča, Galerija sodobne umetnosti Celje. Kustosi razstave: Tomaž Brejc, Alenka Domjan, Jiři Kočica, Polona Tratnik. Premierna predstavitev projekta Las *in vitro* (od 10. 9. do 10.10.).

Las in vitro. Performans-intervencija ob pogovoru: Jurij Krpan in Polona Tratnik, projektna soba SCCA, Metelkova 6, Ljubljana (17. 6.).

2008

In Vitro & Transspecies, dr. Miomir Knežević, galerija Kapelica, Ljubljana (Slovenija), december.

Priloga C: Prikaz podatkov, ki so pridobljeni po izolaciji celic iz maščobe

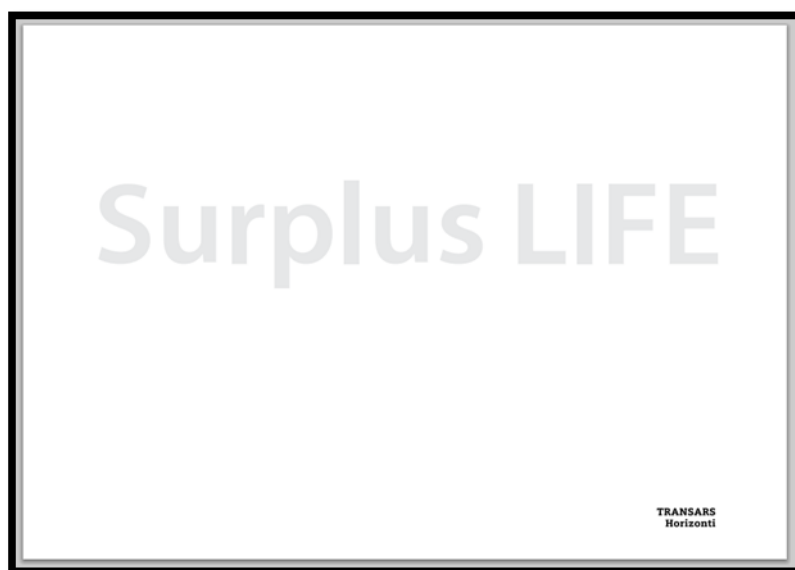
št. izolacij	V lipoaspirata [ml]	V maščobe [ml]	V maščobe [ml]	V po procesiranju [ml]	Št. vseh celic	Št. vseh celic na 100 ml maščobe	Viabilnost (%)	Št. celic iz 1 ml maščobe	Št. viabilnih celic
P1 – Metoda A	6,0	9,0	15,0	3	1,4E+06	1,56E+07	47,00%	1,56E+05	6,58E+05
P1 – Metoda B	4,0	18,0	22,0	3	1,9E+06	1,06E+07	36,00%	1,06E+05	6,84E+05
P 1 – Metoda C	2,0	20,0	22,0	3	2,0E+06	1,00E+07	64,00%	1,00E+05	1,28E+06
P2 – Metoda A	3,0	12,0	15,0	3	1,2E+06	1,00E+07	28,00%	1,00E+05	3,36E+05
P2 – Metoda B	6,0	14,0	20,0	3	1,3E+06	9,29E+06		9,29E+04	0,00E+00
P2 – Metoda C	8,0	12,0	20,0	3	7,0E+05	5,83E+06		5,83E+04	0,00E+00
P2 – Metoda Č	4,0	13,0	17,0	3	9,0E+05	6,92E+06	72,00%	6,92E+04	6,48E+05
P3 – Metoda A	5,0	10,0	15,0	2	6,6E+06	6,60E+07		6,60E+05	0,00E+00
P3 – Metoda B	4,0	15,0	19,0	1,5	7,3E+06	4,87E+07		4,87E+05	0,00E+00
P3 – Metoda C	4,0	16,0	20,0	2,5	7,7E+06	4,81E+07		4,81E+05	0,00E+00
P3 – Metoda D	3,0	15,0	18,0	2,5	7,0E+06	4,67E+07		4,67E+05	0,00E+00
P4 – Metoda A	16	24	40	3	1,00E+07	4,17E+07	82,00%	4,17E+05	8,20E+06
P5 – Metoda A	70	25,1	95,1	5	8,70E+06	3,47E+07	87,00%	3,47E+05	7,57E+06
P6 – Metoda A	40	55	95	5	8,10E+06	1,47E+07	89,00%	1,47E+05	7,21E+06
P7 – Metoda Č	60	35	95	3	1,50E+07	4,29E+07	87,00%	4,29E+05	1,31E+07
P8 – Metoda Č	72	23	95	5	2,50E+06	1,09E+07	78,00%	1,09E+05	1,95E+06

LEGENDA: P (Pacient); metoda A (ročna tehnika), metoda B (peristaltična črpalka), metoda C (odvzem z nadtllačno črpalko (0,9 bar)), metoda Č (MicroAir tehnika) in metoda D (nutacijska infrasonična liposukcija).

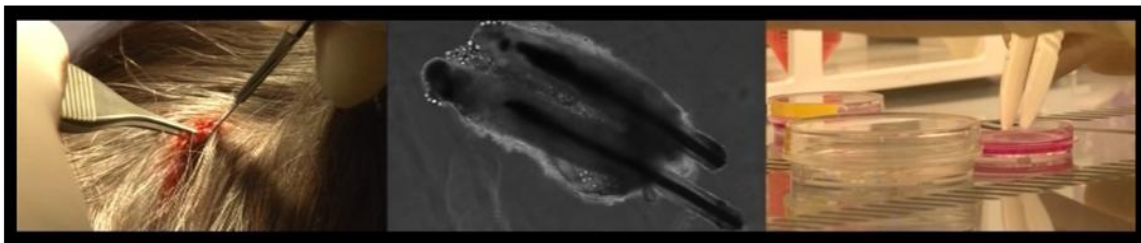
Priloga D: Publikaciji in video material v sklopu projektov Bios *in vitro* in *Iniciacija*



Znanstvena monografija *In vitro živo onstran telesa in umetnosti* (avtorica Polona Tratnik) je dosegljiva na <http://www.horizonti.net/transars/In%20vitro.pdf>



Znanstvena monografija *Surplus LIFE: The Philosophy of Contemporary Transitional Art and Form of Life; With Regards to the Artistic Productions of Polona Tratnik* (avtor Miško Šuvaković) je dosegljiva na <http://www.polona-tratnik.si/knjiga%206%20final.pdf>



Predstavitveni film *12 mm (Operation, Hair in vitro, Laboratory)* je dosegljiv na povezavi http://www.polona-tratnik.si/Hair-In-Vitro-All_New2.mp4



Predstavitveni film *Las in vitro* je dosegljiv na povezavi <http://www.horizonti.net/index.html>

Iniciacija, 2012



Performativna instalacija, mešani mediji (konstruirano človeško srce, tkivni inženiring in električni inženiring, inkubator, bioreaktor in laminar).

Produkcija: Horizonti, ko-produkcija: Biobanka d. o. o., Educell d. o. o.

Iniciacija izvaja regeneracijo funkcionalne mišice človeškega srca z razvijanjem sposobnosti samostojnega pulziranja. Regeneracija vključuje poselitev vpojne organske matrice, tj. decelulariziranega srčnega organa, s kardiomiociti, diferenciranimi iz matičnih celic, pridobljenih iz človeškega maščobnega tkiva. Iniciacija pospeši zorenje tkiva in stremi k dosegu mišičnega odziva – izvaja iniciacijo celic v funkcionalno, tj. krčljivo tkivo ter iniciira pulziranje in vitro konstruiranega organa.

Predstavitveni film *Iniciacija* je dosegljiv na povezavi <http://www.polona-tratnik.si/Initiation.mp4>

Koncept in vizualizacija: Polona Tratnik (vodja projekta), tkivni inženiring: Biobanka d. o. o. (Miomir Knežević, Marko Strbad, Ajda Marič, Petra Konenčnik, Janja Dobravec in sod.), video: Snaut (Marko Cafnik in sod.), fotografija: Damjan Švarc, oblikovanje: Miha Turšič.

Zahvala za postavitev na razstavi Soft Control: umetnost, znanost in tehnološko nezavedno, november—december 2012: Tehnooptika Smolnikar d.o.o., Iskra Pio d.o.o., Zavod za transfuzijsko medicino RS (Primož Rožman, Mojca Jež), Labena d. o. o. (Vida Žgajnar), Nada Udovč Knežević.

Priloga E (CD): Predstavitveni filmi v sklopu projekta in znanstveni monografiji

- 12 mm (operacija, las *in vitro* in laboratorij), predstavitveni film.
- BioStation 1_1, film pridobljen iz aparature BioStation.
- BioStation 1_2, film pridobljen iz aparature BioStation.
- »Hair *in vitro*« (Las *in vitro*), predstavitveni film v angleščini.
- Iniciacija, predstavitveni film.
- Intervju_Knezevic; v sklopu projekta je bil opravljen intervju z doc. dr. Miomirjem Knežević, univ. dipl. biol.
- Intervju_Leskovšek; v sklopu projekta je bil opravljen intervju z Alešem Leskovšek dr.med specialist plastične rekonstrukcijske in estetske kirurgije.
- Las *in vitro*, predstavitveni film.

Producent: Horizonti, zavod za umetnost, kulturo, znanost in izobraževanje.

Znanstveni monografij:

- Šuvaković M. 2011. Surplus LIFE: The Philosophy of Contemporary Transitional Art and Form of Life. Ljubljana, Horizonti, zavod za umetnost, kulturo, znanost in izobraževanje: 110 str
- Tratnik P. 2010. In vitro: živo onstran telesa in umetnosti. Ljubljana, Horizonti, zavod za umetnost, kulturo, znanost in izobraževanje: 185 str