

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Blažka OREL

**UPORABNOST POZITIVNE IMUNOMAGNETNE
SELEKCIJE USMERJENE PROTI ANTIGENU SSEA-4
ZA PRIDOBITEV OBOGATENE CELIČNE
POPULACIJE VSEL CELIC**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Blažka OREL

**UPORABNOST POZITIVNE IMUNOMAGNETNE SELEKCIJE
USMERJENE PROTI ANTIGENU SSEA-4 ZA PRIDOBITEV
OBOGATENE CELIČNE POPULACIJE VSEL CELIC**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**USE OF POSITIVE IMMUNOMAGNETIC SELECTION TARGETING
THE ANTIGEN SSEA-4 FOR OBTAINING ENRICHED CELL
POPULATION OF VSEL CELLS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je nastalo v okviru Univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v laboratoriju Centra za tipizacijo tkiv, ki deluje v sklopu Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je odobrila prijavljeno diplomsko delo in za mentorja imenovala doc. dr. Miomirja Kneževiča, za somentorja doc. dr. Urbana Švajgerja in za recenzentko prof. dr. Tanjo Kunej.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Član: doc. dr. Urban ŠVAJGER
Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Članica: prof. dr. Tanja KUNEJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

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

Blažka OREL

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dn
DK	UDK 606:61(043.2)
KG	biotehnologija/pozitivna imunomagnetna selekcija/pluripotentne matične celice/ VSEL/popkovnična kri/SSEA-4/pretočna citometrija
AV	OREL, Blažka
SA	KNEŽEVIĆ, Miomir (mentor)/ŠVAJGER, Urban (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, študij biotehnologije
LI	2015
IN	UPORABNOST POZITIVNE IMUNOMAGNETNE SELEKCIJE USMERJENE PROTI ANTIGENU SSEA-4 ZA PRIDOBITEV OBOGATENE CELIČNE POPULACIJE VSEL CELIC
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 49 str., 6 pregl., 16 sl., 87 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	V preteklosti so v različnih tkivih odraslega človeka odkrili in dokazali matične celice s sposobnostjo diferenciacije v različne specifične tipe celic. Obstaja torej teoretska podlaga, ki predpostavlja možnost pridobitve pluripotentnih matičnih celic iz zrelega osebk. Ti poskusi izolacije pa se soočajo z mnogimi problemi, zato je iskanje "zlatega standarda" med obstoječimi izolacijskimi pristopi za pridobitev teh celic toliko pomembno. Med te najpogostejše spada imunomagnetna selekcija, ki je bila v našem primeru usmerjena proti SSEA-4 (<i>ang.</i> Stage-Specific Embryonic Antigen-4). Poglavitni namen naše študije je bila preučitev te metode kot ustreznega izolacijskega postopka za pridobitev obogatene celične populacije s karakteristikami VSEL matičnih celic (<i>ang.</i> Very Small Embryonic-Like Stem Cells). Za biološki vzorec smo izbrali popkovnično kri, ki predstavlja enega najbolj dosegljivih virov matičnih celic pri človeku. Njen odvzem je popolnoma neinvaziven, hkrati pa so vzorci na voljo v razmeroma velikih količinah. Želeli smo pridobiti celično populacijo, ki bi bila po fenotipski karakterizaciji obogatena v podtipih CD45 ⁻ /CD34 ⁺ , CD45 ⁻ /CD133 ⁺ in CD45 ⁻ /CXCR4 ⁺ . Najprej smo s pretočno citometrijo dokazali prisotnost SSEA-4 ⁺ celic, nato smo nadaljevali z metodo MACS. Ugotovili smo, da izbrana izolacijska metoda ni primerna za pridobitev celične populacije s karakteristikami VSEL celic oz. celične frakcije, iz katere lahko nadaljnje izoliramo VSEL celice visoke čistosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn

DC UDK 606:61(043.2)

CX biotechnology/positive immunomagnetic selection/pluripotent stem cells/
VSELs/umbilical cord blood/SSEA-4/flow cytometry

AU OREL, Blažka

AA KNEŽEVIĆ, Miomir (supervisor)/ŠVAJGER, Urban (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study Programme in Biotechnology

PY 2015

TI USE OF POSITIVE IMMUNOMAGNETIC SELECTION TARGETING THE
ANTIGEN SSEA-4 FOR OBTAINING ENRICHED CELL POPULATION OF
VSEL CELLS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO X, 49 p., 6 tab., 16 fig., 87 ref.

LA sl

AL sl/en

AB In the past, there were identified, in various human adult tissues, stem cells with the ability to differentiate into various specific cell types. Therefore exists a theoretical basis, which assumes the possibility of obtaining pluripotent stem cells from mature specimen. These attempts of isolation are faced with many problems, so the search for "gold standard" between the existing isolation approaches for obtaining these cells is very important. Among those an immunomagnetic selection is most frequently used, which in our case was targeting SSEA-4 (Stage-Specific Embryonic Antigen-4). The main purpose of our study was the examination of this method as a suitable isolation procedure for obtaining enriched cell population of VSEL (Very Small Embryonic-Like) stem cells. For the biological sample we chose umbilical cord blood, which is one of the most accessible sources of stem cells in humans. Taking blood is completely noninvasive and samples are available in relatively large quantities. We wanted to obtain a cell population that would be according to the phenotypic characterization enriched in subtypes of CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/CD133⁺ and CD45⁻/CXCR4⁺. First we identified the presence of SSEA-4⁺ cells by flow cytometry, then we continued with the MACS method. We have found that examined isolation method is not suitable for obtaining an enriched cell population of VSELs or cell fractions from which we could further isolate VSELs of high purity.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 DEFINICIJA MATIČNE CELICE	3
2.2 TIPI MATIČNIH CELIC IN NJIHOV IZVOR	3
2.3 POTENTNOST MATIČNIH CELIC	4
2.3.1 Potentnost v času zgodnjega embrionalnega razvoja	4
2.3.2 Pluripotentnost	5
2.3.2.1 Pluripotentne matične celice	5
2.3.2.1.1 Embionalne karcinomske celice	6
2.3.2.1.2 Embrionalne matične celice	6
2.3.2.1.3 Matične celice epiblasta	7
2.3.2.1.4 Pluripotentne linije iz spolnih celic	7
2.3.2.1.5 Reprogramirane pluripotentne matične celice	8
2.3.2.2 Domnevne pluripotentne matične celice	9
2.3.2.2.1 Endotelijske progenitorske celice	9
2.3.2.2.2 Mezenhimske matične celice	9
2.3.2.2.3 Multipotentne prednice odraslega	10
2.3.2.2.4 MIAMI celice	10
2.3.2.2.5 Humane multipotentne odrasle matične celice	10
2.3.2.2.6 VSEL celice	11
2.4 POPKOVNIČNA KRI	12
2.4.1 Krvotvorne matične celice	12
2.4.2 Zbiranje popkovnične krvi	13
2.4.3 Banke popkovnične krvi	13

2.5	TERAPEVTSKI POTENCIAL MATIČNIH CELIC IN IZZIVI ZA PRIHODNOST	14
3	MATERIAL IN METODE	17
3.1	POTEK DELA	17
3.2	MATERIAL	18
3.3	METODE	18
3.3.1	Pridobivanje vzorcev popkovnične krvi	18
3.3.2	Izolacija celic s fokolom ter gradientno centrifugiranje	18
3.3.3	Števna komorica in izračun števila levkocitov	19
3.3.4	Označevanje z Anti-SSEA-4 ter barvanje s specifičnimi markerji	19
3.3.5	Ločevanje celic z metodo MACS® (Miltenyi Biotec, Nemčija)	20
3.3.6	Identifikacija celične populacije za specifične markerje	21
4	REZULTATI	22
4.1	KARAKTERISTIKE VZORCEV POPKOVNIČNE KRVI	22
4.2	DOLOČITEV DELEŽA SSEA-4 ⁺ CELIC	23
4.3	KARAKTERIZACIJA CELIC S POMOČJO SPECIFIČNIH OZNAČEVALCEV	24
4.3.1	Karakterizacija celic po izolaciji s fokolom	24
4.3.2	Karakterizacija celic po magnetni izolaciji	27
4.3.3	Pregled rezultatov dobljenih po izolaciji s fokolom in po MACS	30
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	31
5.1	RAZPRAVA	31
5.1.1	Vzorci popkovnične krvi	32
5.1.2	Izolacija s fokolom ter delež SSEA-4 ⁺ celic	33
5.1.3	MACS in primerjava rezultatov po obeh izolacijah	36
5.2	SKLEPI	39
6	POVZETEK	40
7	VIRI	42
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 1: Razvoj zarodnih plasti pri sesalcih (Gilbert, 2000)	5
Slika 2: Potencialno zdravljene bolezni s pomočjo matičnih celic (Mimeault, 2006)	15
Slika 3: Shema poteka eksperimentalnega dela	17
Slika 4: Plasti celic po gradientnem centrifugiranju (Cedarlane Laboratories Ltd., 2013)	19
Slika 5: Število SSEA-4 ⁺ celic po fikolu (Eksperiment št. 1)	23
Slika 6: Število SSEA-4 ⁺ celic po fikolu (Eksperiment št. 2)	23
Slika 7: Enotna celična populacija z izraženimi označevalci po izolaciji s fokolom	24
Slika 8: Celična populacija regije 1 z izraženimi označevalci po izolaciji s fokolom	25
Slika 9: Celična populacija regije 2 z izraženimi označevalci po izolaciji s fokolom	25
Slika 10: Celična populacija regije 3 z izraženimi označevalci po izolaciji s fokolom	26
Slika 11: Celična populacija regije 4 z izraženimi označevalci po izolaciji s fokolom	26
Slika 12: Enotna celična populacija z izraženimi označevalci po MACS	27
Slika 13: Celična populacija regije 1 z izraženimi označevalci po MACS	28
Slika 14: Celična populacija regije 2 z izraženimi označevalci po MACS	29
Slika 15: Celična populacija regije 3 z izraženimi označevalci po MACS	29
Slika 16: Celična populacija regije 4 z izraženimi označevalci po MACS	30

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pozitivni in negativni označevalci VSEL celic	12
Preglednica 2: Pripravljene epruvetke za pretočno citometrijo	20
Preglednica 3: Karakteristike vzorcev popkovnične krvi pred izolacijo s fokolom	22
Preglednica 4: Število levkocitov pridobljenih po izolaciji s fokolom	22
Preglednica 5: Število levkocitov pridobljenih po MACS	27
Preglednica 6: Pridobljeni rezultati po izolaciji s fokolom ter po MACS	30

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BMPR1B	<i>ang.</i> bone morpho-genetic protein receptor 1B
CBE	embrionalna matična celica popkovnične krvi (<i>ang.</i> cord blood-derived embryonic stem cell)
CB-MPC	multipotenta progenitorska celica popkovnične krvi (<i>ang.</i> cord blood multipotent progenitor cell)
CB-SC	krvotvorna matična celica izolirana iz popkovnične krvi (<i>ang.</i> cord blood-stem cell)
CB-VSEL	zelo majhne celice, podobne embrionalnim matičnim celicam, izolirane iz človeške popkovnične krvi (<i>ang.</i> cord blood-derived VSEL)
CD	označevalec pripadnosti (<i>ang.</i> cluster of differentiation)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (<i>ang.</i> deoxyribonucleic acid)
ECC	embrionalna karcinomska celica (<i>ang.</i> embryonic carcinoma cell)
EGC	embrionalna zarodna celica (<i>ang.</i> embryonic germ cell)
EPC	endotelijska progenitorska celica (<i>ang.</i> endothelial progenitor cell)
EpiSC	matična celica iz epiblasta (<i>ang.</i> epiblast stem cell)
ESC	embrionalna matična celica (<i>ang.</i> embryonic stem cell)
FACS	ločevalnik fluorescenčno označenih celic (<i>ang.</i> fluorescence-activated cell sorter)
FBS	fetalni goveji serum (<i>ang.</i> fetal bovine serum)
FISH	fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija
FITC	fluorescein izotiacianat
FSC	prednje sipanje svetlobe (<i>ang.</i> forward-scatter)
GBM	glioblastom multiformae
hiPSC	človeška inducirana pluripotentna matična celica (<i>ang.</i> human induced pluripotent stem cell)
HLA	humani levkocitni antigen
hMACS	človeška multipotentna odrasla matična celica (<i>ang.</i> human multipotent adult stem cell)
HSC	krvotvorna matična celica (<i>ang.</i> hematopoietic stem cell)
hWJSCs	človeške matične celice Whartonove žolice (<i>ang.</i> human umbilical cord Wharton's jelly stem cells)
ICM	notranja celična masa (<i>ang.</i> inner cell mass)

iPSC	inducirana pluripotentna matična celica (<i>ang.</i> induced pluripotent stem cell)
IVF	<i>in vitro</i> fertilizacija
Lin ⁻	linijsko neusmerjena celica
MACS	imunomagnetno ločevanje (<i>ang.</i> magnetic-activated cell sorting)
MAPC	multipotentna prednica odraslega (<i>ang.</i> multipotent adult progenitor cell)
mEGC	multipotentna embrionalna zarodna celica (<i>ang.</i> multipotential embryonic germ cell)
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (<i>ang.</i> major histocompatibility complex)
MIAMI	<i>ang.</i> marrow-isolated adult multilineage inducible cell
MNC	enojedrna celica (<i>ang.</i> mononuclear cell)
MSC	mezenhimska matična celica (<i>ang.</i> mesenchymal stem cell)
NTKR3	<i>ang.</i> neutrophilic tyrosine kinase receptor 3
Oct-4	oktamer 4 (<i>ang.</i> octamer-binding transcription factor 4)
PBS	fosfatni pufer (<i>ang.</i> phosphate buffered saline)
PE	fikoeritrin
PGC	primordialna zarodna celica (<i>ang.</i> primordial germ cell)
PK	popkovnična kri
SCNT	prenos jedra somatske celice (<i>ang.</i> somatic cell nuclear transfer)
Sox-2	<i>ang.</i> sex determining region Y-box 2
SSC	stransko sipanje svetlobe (<i>ang.</i> side-scatter)
SSEA	<i>ang.</i> stage-specific embryonic surface antigen
TRA	T-celični receptor alfa (<i>ang.</i> T-Cell receptor alpha)
USSCs	neomejene somatske matične celice (<i>ang.</i> unrestricted somatic stem cells)
VSEL	zelo majhne celice, podobne embrionalnim matičnim celicam (<i>ang.</i> very small embryonic-like stem cells)

1 UVOD

V preteklih letih so v različnih tkivih odraslega človeka odkrili in dokazali matične celice z diferenciacijsko sposobnostjo, ki je bila podobna embrionalnim matičnim celicam. Veliko raziskav je potrdilo teorijo, da so embrionalne matične celice prisotne v odraslih tkivih in organih po vsej verjetnosti odložena v periferna tkiva med ontogenezo. Obstaja torej teoretska podlaga, ki predpostavlja možnost pridobitve pluripotentnih matičnih celic iz zrelega osebk.

Pluripotentne matične celice izkazujejo velik potencial za uporabo v terapevtske namene, zato je njihova izolacija še toliko pomembnejša. Ti poskusi izolacije pa se soočajo z izjemno nizko prisotnostjo pluripotentnih matičnih celic v bioloških vzorcih, zato je uspeh pridobitve obogatene celične populacije v veliki meri odvisen od raznolikih izolacijskih pristopov. Med te najpogostejše spada imunomagnetna selekcija, kjer označimo in pozitivno izoliramo celice, ki izražajo pluripotentne označevalce. Mi smo označevali z antigenom SSEA-4 (*ang.* Stage-Specific Embryonic Antigen-4), ki je značilno izražen na nediferenciranih človeških embrionalnih matičnih celicah, induciranih pluripotentnih celicah, embrionalnih karcinomskih celicah in embrionalnih zarodnih celicah, kakor tudi na različnih somatskih matičnih celicah (npr. matične celice zobne pulpe), celicah VSEL (*ang.* very small embryonic-like stem cells) ter mezenhimskih matičnih celicah (Miltenyi Biotec, 2012).

Veliko pozornosti se zadnji čas namenja ravno VSEL celicam, ki so bile odkrite nedavno nazaj in kažejo podobne lastnosti kot embrionalne matične celice, zato se opravičeno domneva, da bi jih lahko uporabljali v terapevtske namene. Pomemben vir za izolacijo VSEL celic je popkovnična kri, ki predstavlja enega najbolj dosegljivih virov matičnih celic pri človeku. Način odvzema krvi je popolnoma neinvaziven, vzorec je na voljo v razmeroma velikih količinah in je iz etičnega vidika nesporna metoda.

Trenutno še ni na razpolago t.i. "zlatega standarda" med obstoječimi pristopi za pridobitev pluripotentnih matičnih celic. Nove izolacijske metode zato definitivno predstavljajo aktualno tematiko na področju raziskovanja in uporabe matičnih celic, tako v regenerativni medicini kot v drugih aplikativnih disciplinah.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je preučitev pozitivne imunomagnetne selekcije usmerjene proti antigenu SSEA-4 kot ustrezne izolacijske metode za pridobitev obogatene celične populacije s frakcijami, ki so značilne za celice VSEL iz vzorca popkovnične krvi.

Ravno tako smo želeli preveriti ali lahko iz popkovnične krvi z uporabo imunomagnetne izolacije pridobimo celično populacijo, ki je po fenotipski karakterizaciji obogatena v podtipih $CD45^+CD34^+$, $CD45^+CD133^+$ in $CD45^+CXCR4^+$, ki so značilni za celice VSEL.

1.2 HIPOTEZE

Naše delovne hipoteze so bile:

- v človeški popkovnični krvi se nahaja celična populacija, ki je pozitivna za antigen SSEA-4;
- s postopkom pozitivne imunomagnetne selekcije usmerjene proti antigenu SSEA-4 lahko pridobimo celično populacijo, ki je po fenotipski karakterizaciji obogatena v podtipih $CD45^{-}CD34^{+}$, $CD45^{-}CD133^{+}$ in $CD45^{-}CXCR4^{+}$, ki so značilni za celice VSEL;
- metoda pozitivne imunomagnetne selekcije usmerjene proti antigenu SSEA-4 je primerna za pridobitev celične frakcije, iz katere lahko nadaljnje izoliramo VSEL celice visoke čistosti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DEFINICIJA MATIČNE CELICE

Izvirne oz. matične celice so funkcionalno opredeljene kot celice, ki imajo sposobnost samoobnavljanja, kot tudi zmožnost produciranja diferenciranih celic (Weissman in sod., 2001; Smith, 2001). Bolj natančno, matične celice lahko ustvarjajo hčerinske celice enake svoji materinski celici (samoobnavljanje), kot tudi proizvodnjo potomcev z bolj omejenim potencialom (diferencirane celice). Ta preprosta in široka opredelitev je lahko zadovoljiva za embrionalne matične celice ali matične celice zarodkov, ki ne preživijo za čas trajanja nekega organizma. Vendar je pomembno, da pri opisovanju odraslih matičnih celic dodatno omejimo to definicijo izvornih celic na celice, ki se samostojno obnavljajo v celotnem življenjskem obdobju živali (Van der Kooy in Weiss, 2000).

Drug parameter, ki ga je treba upoštevati, je potentnost oz. plastičnost: Ali matična celica ustvari več raznolikih tipov celic (multipotentne), ali je sposobna proizvajati le eno vrsto diferenciranih celic (unipotentne)? Vprašanje potentnosti se lahko zaključi z jasno opredelitvijo unipotentnih celic kot progenitorskih celic, ki so po navadi potomci matičnih celic. Vendar so progenitorske celice bolj omejene v njihovem diferenciacijskem potencialu oz. sposobnosti za samoobnavljanje in so pogosto bolj omejene v obeh pomenih (Weissman in sod., 2001).

Skratka, delovna definicija matične celice je objekt, sposoben samoobnavljanja in kloniranja, ki je multipotentne narave in tako lahko ustvari več raznolikih tipov celic. Ta opis matičnih celic tako vključuje upoštevanje sposobnosti replikacije, kloniranja in potentnosti (Lanza in sod., 2009).

2.2 TIPI MATIČNIH CELIC IN NJIHOV IZVOR

Do današnjega dne so bili izolirani različni tipi matičnih celic iz raznih človeških tkiv. Glede na biokemijske in genetske markerje jih klasificiramo v embrionalne matične celice (ESC, *ang.* embryonic stem cells), mezenhimske matične celice (MSC, *ang.* mesenchymal stem cells) in krvotvorne matične celice (HSC, *ang.* hematopoietic stem cells). ESC so ustvarjene iz presežka *in vitro* fertilizacijskih (IVF) zarodkov, MSC iz tkiv zarodka in odraslih organov, HSC pa iz kostnega mozga, periferne in popkovnične krvi. Plastičnost ali t.i. potentnost se ravno tako pri vseh treh tipih matičnih celic razlikuje in sicer, da veljajo ESC za najbolj vsestranske, saj se teoretično lahko diferencirajo v skoraj vsako vrsto tkiva v človeškem telesu. Torej lahko rečemo, da so ESC pluripotentne ali poenostavljeno, materinske celice vseh celic (Bongso, 2013).

Poreklo matičnih celic se dobro razume za ESC, vendar pa je njihov izvor v odraslih tkivih manj jasen in v nekaterih primerih celo kontroverzen. Dejstvo, da ESC izvirajo iz zgodnjih faz razvoja zarodka, razsvetljuje zanimivo možnost, da je to lahko mehanizem za razvoj multipotentnih matičnih celic, vključno nekaterih odraslih matičnih celic. Potemtakem se

ESC razvojno usmerijo že zgodaj v embrionalnem razvoju ob gastrulaciji, ko se oblikujejo tri zarodne plasti: endoderm, mezoderm in ektoderm, iz katerih se razvijejo vsa tkiva v odraslem človeku. Premalo informacij o izvoru odraslih matičnih celic pa odpira možnost, da se le-te izognejo usmeritvi v zgodnji fazi zarodka in nato kolonizirajo specifične niše v tkivih in organih, ki delujejo, da ohranijo svojo potentnost, kakor tudi omejijo rodovni potencial. To prepričanje je bolj prevladujoče, čeprav še vedno neutemeljeno (Melton in Cowan, 2009).

2.3 POTENTNOST MATIČNIH CELIC

2.3.1 Potentnost v času zgodnjega embrionalnega razvoja

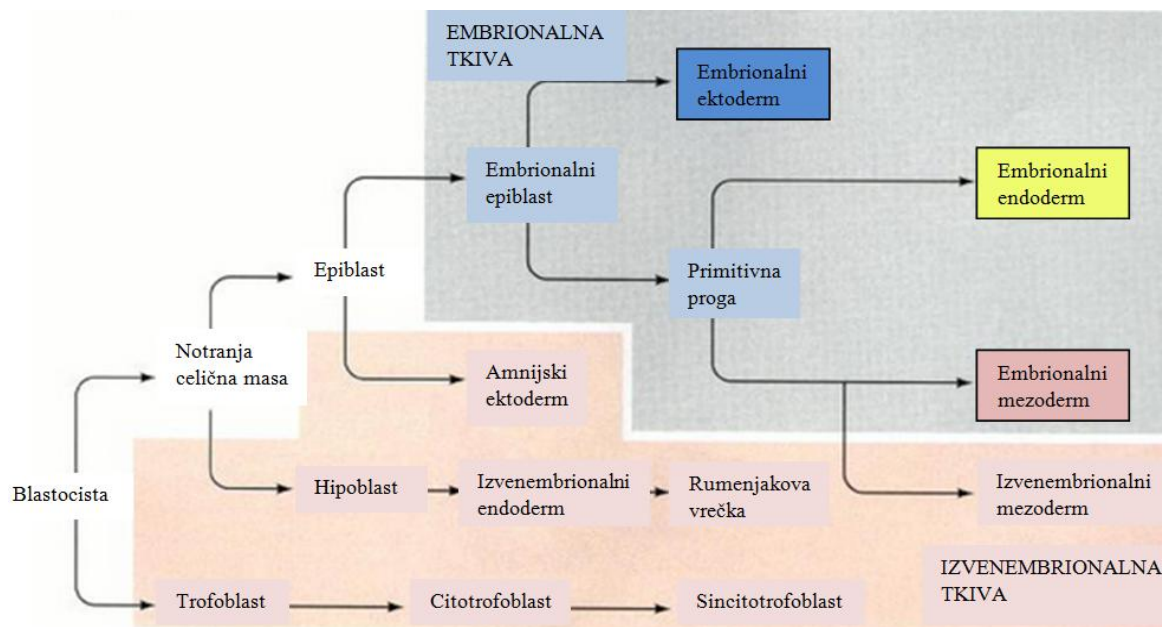
Matične celice zaradi različnega diferenciacijskega potenciala delimo na totipotentne, pluripotentne, multipotentne in mono- oz. unipotentne. V ontogenezi so prve matične celice totipotentne in segajo vse od zigote do notranje celične mase (ICM, *ang.* inner cell mass) blastociste. Kmalu zatem totipotentne matične celice povzročijo razvoj somatskih (ali progenitorskih celic) in primitivnih zarodnih matičnih celic (Weissman, 2000).

Embrionalni razvoj se prične z združitvijo moške in ženske spolne celice, kjer nastane zigota. Le-ta predstavlja najprimitivnejšo totipotentno celico, iz katere se razvije celotni organizem. V procesu brazdanja s serijo delitev nastanejo prve blastomere. Število in čas delitev narekujejo materinski geni v oocitah, ki pa so v vsaki vrsti organizma specifični (Tarkowski, 1959). Blastomere se nato med kompaktacijo začno združevati v skupek celic ali morulo. Ta med kavitacijo izloči tekočino v notranjost embrija in nastane blastocel, iz katerega se razvije blastocista (Gilbert, 2000).

Po prvi diferenciaciji v embrionalnem razvoju sesalcev nastane prvo izvenembrionalno tkivo, trofoektoderm, ki tvori zunanjo celično plast blastociste, imenovano trofoblast. Iz njega se razvije horion, embrionalni del placente (Gilbert, 2000). Notranja plast blastociste predstavlja notranja celična masa, ki vključuje pluripotentne matične celice, iz katerih se razvije epiblast (Gardner in Rossant, 1979). Epitelizacija ICM v plast celic epiblasta prispeva k razvoju embrionalnega epiblasta, katerega celice potujejo skozi posteriorni del primitivne proge in sprožijo razvoj zarodka (Tam in Behringerb, 1997). Iz druge skupine celic epiblasta pa se tvori amnion kot obloga okoli amnijske votline, ki jo napolni amnijska tekočina. Del ICM predstavlja tudi hipoblast oz. primitivni endoderm. Ta iz notranje strani obda blastocel in tvori izvenembrionalni endoderm, iz katerega nastane rumenjakova vrečka (Gilbert, 2000).

Osrednji dogodek v embriogenezi predstavlja razvoj vseh treh zarodnih plasti, in sicer ektoderma, mezoderma in endoderma (Slika 1). Razvijejo se v procesu gastrulacije, ki se začne s formacijo primitivne proge. Primitivna proga je prehodna struktura v regiji epiblasta, ki navsezadnje tvori embrionalni endoderm ter mezoderm (Tam in Behringerb, 1997). V primerjavi z mezodermom in endodermom se ektoderm razvije iz anteriorne regije epiblasta, ki ne vstopi v primitivno progo (Murry in Keller, 2008).

Ko se celice embrionalnega epiblasta mobilizirajo in začno potovati preko primitivne proge, sledi nastanek izvenembrionalnega mezoderma (Murry in Keller, 2008) ter tako ne prispeva k razvoju embrionalnih tkiv.



Slika 1: Razvoj zarodnih plasti pri sesalcih (Gilbert, 2000)

V vseh treh zarodnih plasteh celic se nahajajo multipotentne matične celice, ki lahko tvorijo samo tkiva, značilna za zarodno plast, iz katere izhajajo (Gilbert, 2000). Preko organogeneze pa se v nadaljnje razvijejo vedno bolj diferencirani tipi matičnih celic, se pravi matične celice, ki so tkivno specifične in unipotentne (Ratajczak in sod., 2007).

2.3.2 Pluripotentnost

Pluripotentnost je karakteristika celic v ICM blastociste, iz katere se razvijejo ESC in je ključen faktor za opis embrionalnih matičnih celičnih linij (Smith in sod., 2009). Natančneje rečeno je pluripotentnost sposobnost ESC celic, da producirajo tkiva iz vseh treh zarodnih plasti (ektoderm, mezoderm in endoderm), ko so presajene v miš s pomanjkljivo imunostjo (Bongso, 2013).

V razvojni biologiji je pluripotentnost obravnavana kot potencial določene celice, da se razvije v vse možne tipe celic, najdenih v zarodku ali odraslem organizmu. Kakorkoli že, natančna definicija pluripotentnosti še vedno ostaja subjekt debate v politični areni ter širši znanstveni skupnosti.

2.3.2.1 Pluripotentne matične celice

Med pluripotentne celice predvsem uvrščamo celice, ki izvirajo iz embrionalnih struktur, kot so blastomere, ICM ter epiblast. Kot pluripotentne celice obravnavamo tudi tiste, ki izvirajo iz primordialnih zarodnih celic ali pa iz odraslih spolnih celic (Jaenisch in Young,

2008). Njihova posebnost je ta, da jih lahko ustvarimo tudi z reprogramiranjem somatskih celic (Bang in Carpenter, 2009). V nasprotju s totipotentnimi celicami pluripotentne med razvojem ne tvorijo trofoektoderma, ki je potreben za razvoj izvenembrionalnih struktur kot je placenta (Smith in sod., 2009).

2.3.2.1.1 Embionalne karcinomske celice

Tetrakarcinomi so maligni tumorji spolnih celic sestavljeni iz nediferencirane embrionalne karcinomske celice (ECC, *ang.* embryonic carcinoma cells) in diferencirane komponente, ki lahko vključuje vse tri zarodne plasti. Obstočnost komponente ECC omogoča tetrakarcinomom, da so serijsko presajeni med mišmi, ker te nediferencirane celice delujejo kot matične celice za druge tumorske komponente (Yu in Thomson, 2008). Leta 1964 sta Kleinsmith in Pierce (1964) demonstrirala, da je posamezna ECC sposobna tako neomejenega samo-obnavljanja kot multilinijske diferenciacije, kar je za tisti čas pomenilo določitev obstoja pluripotentne matične celice.

Mišje celične linije embrionalnega karcinoma, ki se stabilno *in vitro* razmnožujejo, so bile vzpostavljene v začetku leta 1970 (Kahan in Ephrussi, 1970) in so bili obširno raziskane kot "*in vitro* karikature razvoja", saj bi se lahko gojile v zadostnih količinah za namen izvajanja poskusov, ki bi bili sicer nemogoči z intaktnimi zarodki sesalcev.

Mišje ECC izražajo antigene in proteine, ki so podobni celicam v ICM (Gachelin in sod. 1977), kar vodi do koncepta, da so ECC *in vitro* ekvivalent pluripotentnih celic prisotnih v ICM (Martin, 1980). Vendar pa ima večina celičnih linij embrionalnega karcinoma omejen razvojni potencial in slabo prispevajo k himernim mišim, verjetno zaradi kopičenja genetskih sprememb med samo formacijo in rastjo tetrakarcinoma (Atkin in sod., 1974).

ECC človeškega izvora so bile pridobljene naknadno (Hogan in sod., 1977) in so se izkazale za bistveno drugačne od mišjih ECC. Na primer, SSEA-1 celični površinski marker, posebej izražen na mišjih ECC, je odsoten na človeški ECC, medtem so SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 in TRA-1-81 odsotni na mišjih ECC in prisotni na človeških ECC (Andrews et al., 1982, 1984; Kannagi et al., 1983). Prav tako v nasprotju z mišjimi ECC so človeške ECC zelo aneuploidne, kar verjetno nakazuje na njihovo nezmožnost diferenciranja v širok spekter somatskih celičnih tipov ter na njihovo omejeno uporabo kot *in vitro* modela pri človekovem razvoju (Yu in Thomson, 2008).

2.3.2.1.2 Embrionalne matične celice

Prve embrionalne matične celice (ESC, *ang.* embryonic stem cells) so pridobili leta 1981 iz mišjih blastocist in so jih kasneje gojili na hranilni plasteh fibroblastov z dodatkom seruma (Evans in Kaufman, 1981; Martin, 1981). Embrionalne matične celične kulture pridobljene klonsko iz ene same celice se lahko diferencirajo v različne celične tipe *in vitro* in tvorijo tetrakarcinome pri injiciranju le-teh v miši (Martin, 1981). Mišje ESC lahko prispevajo k visoki raznolikosti tkiv v himerah in hkrati zagotavljajo praktičen način za uvedbo modifikacij v mišji zarodni liniji (Bradley in sod., 1984).

Znanstvenikom pa je prvič uspelo izolirati človeške ESC leta 1998 (Thomson in sod., 1998), razlog za tolikšno zakasnitev glede na izolacijo mišjih ESC je bil v različni vrsti organizma in ustreznosti kulturnega medija za človeški embrio. Človeške ESC so po kariotipu normalne celice in skozi proliferacijo obdržijo potencial za razvoj vseh treh zarodnih plasti (Amit in sod., 2000). Podobno kot mišje ESC so bile človeške ESC izolirane iz morule, kasnejše faze blastociste, blastomere in patogenih zarodkov. Ni še znano ali imajo pluripotentne celične linije, pridobljene iz omenjenih različnih virov, kakršne koli dosledne razlike v razvoju ali če imajo enak potencial (Yu in Thomson, 2008).

Za oboje vrst ESC velja, da izražajo enake osnovne transkripcijske faktorje, ki so značilni pluripotentni označevalci (Bang in Carpenter, 2009) in sicer Oct-4, Sox-2 ter Nanog. Se pa mehanizmi vzdrževanja pluripotentnosti med mišjimi in človeškimi ESC zelo razlikujejo. Te razlike bi lahko bile posledice različnega embrionalnega razvoja vrst ali pa so že same populacije celic na različnih stopnjah v embrionalnem razvoju (Rossant, 2008).

2.3.2.1.3 Matične celice epiblasta

Prve pluripotentne matične celice epiblastov (EpiSC, *ang.* epiblast stem cells) so pridobili iz postimplantacijskih mišjih zarodkov in se znatno razlikujejo od mišjih ESC, vendar si delijo ključne karakteristike s človeškimi ESC (Rossant, 2008).

Mišje EpiSC so pluripotentne embrionalne matične celice, ki se v grobem diferencirajo v celice, ki nastanejo iz funkcionalnih somatskih ter zarodnih celic, zato so zelo uporabne pri raziskovanju razvojne in regenerativne medicine (Factor in sod., 2013).

Bistvena razlika med človeškimi in mišjimi EpiSC je v tem, da so človeške EpiSC v nekakšni zgodnji fazi epiblasta in se posledično ne zavezujejo določeni razvoji poti, kar pomeni, da imajo možnost vseh razvojnih poti, vključno z razvojem trofoblasta. Mišje EpiSC pa so, linijsko gledano, omejene epiblast progenitorske celice (Rossant, 2008).

EpiSC so zmožne proizvesti tkiva iz vseh treh zarodnih plasti *in vitro* ter tvorijo teratome (Brons in sod., 2007; Tesar in sod., 2007). Tako mišje kot človeške EpiSC izražajo kombinacije transkripcijskih faktorjev, predvsem Oct4, Sox2 in Nanog (Brons in sod., 2007).

2.3.2.1.4 Pluripotentne linije iz spolnih celic

Embrionalne zarodne celice (EGC, *ang.* embryonic germ cells) so bile prvič izolirane l. 1992 iz primordialnih zarodnih celic (PGC, *ang.* primordial germ cells) (Matsui in sod., 1992; Resnick in sod., 1992). EGC se morfološko gledano ne razlikujejo od mišjih ESC in izražajo tipične ESC markerje kot npr. SSEA-1 ter Oct-4. In podobno kot ESC lahko ob vnosu v blastocisto v veliki meri prispevajo k razvoju vseh celičnih tipov, vključno s spolnimi celicami. Za razliko od ESC pa EGC ohranijo nekatere značilnosti PGC, kot so demetilacija na ravni celotnega genoma, izbris genomskega vtisnjenja in ponovna aktivacija kromosoma X (Labosky in sod., 1994; Tada in sod., 1997).

Multipotentne embrionalne matične celice, tudi poimenovane multipotentne embrionalne zarodne celice (mEGC, *ang.* multipotential embryonic germ cells), veljajo za prve pluripotentne linije izolirane iz neonatanih ter odraslih mišjih testisov (Kanatsu-Shinohara in sod., 2004; Guan in sod., 2006). mEGC imajo podobno morfologijo kot mišje ESC, izražajo tipične mišje ESC površinske označevalce, se multi-linijsko diferencirajo *in vitro*, tvorijo teratome in prispevajo k razvoju vseh celičnih tipov, vključno s spolnimi celicami. Imajo pa različen epigenetski profil od mišjih ESC ter matičnih celic zarodne linije (Kanatsu-Shinohara in sod., 2004). Ni še znano, ali predstavljajo endogeno populacijo matičnih celic v testisih, ali pa so zgolj poselidica reprogramiranja z gojenjem *in vitro* (Yu in Thomson, 2008).

Prvo izolacijo človeških EGC so poročali l. 1998 (Shamblott in sod., 1998), vendar se je kljub prizadevanju proliferacijski potencial EGC na dolgi rok izkazal omejen (Turnpenny in sod., 2003). V zgodnjih pasažah se lahko diferencirajo v vse tri zarodne plasti *in vitro*, vendar do sedaj to še ni bilo dokazano, ravno tako še ni bilo poročanja o tem, da bi človeške EGC tvorile teratome. V primerjavi s človeškimi ESC zahtevajo drugačne gojitvene pogoje, poleg tega se človeške EGC morfološko zelo razlikujejo od človeških ESC in izražajo SSEA-1 površinski marker, ki je pri človeških ESC odsoten (Yu in Thomson, 2008).

2.3.2.1.5 Reprogramirane pluripotentne matične celice

Pluripotentne embrionalne matične celice lahko pridobimo tudi z reprogramiranjem somatskih celic odraslega človeka. Med metode reprogramiranja spadajo gojenje celičnih kultur, fuzija celic, jedrni prenos somatske celice (SCNT, *ang.* somatic cell nuclear transfer) ter virusna transdukcija transkripcijskih faktorjev (Bang in Carpenter, 2009).

Takoj po izolaciji človeških ESC je bilo predlagano, da bi lahko uporabili metodo SCNT za ustvarjanje pacientu specifične matične celice. Vseeno pa se je uporaba SCNT pri človeškem materialu izkazala za zahtevno in so jo tako šele pred par leti uspeli izpeljati pri primatih (Byrne in sod., 2007). Uspeh SCNT je demonstriral, da bi se reprogramiranje lahko usmerjalo s transakcijskimi dejavniki, žal pa je postopek premalo učinkovit, da bi bil uporaben za terapevtske namene pri človeku (Yu in Thomson, 2008).

Skozi celično fuzijo somatskih celic s pluripotentnimi celicami so bile ECC, ESC in EGC sposobne vrnitve diferencirane somatske celice v pluripotentne matične celice (Cowan in sod., 2005; Yu in sod., 2006), kar kaže na prisotnost podobnih aktivnosti reprogramiranja kot jih imajo pluripotentne matične celice. Uspešnost reprogramiranja somatskega jedra je bila potrjena z aktivacijo kromosoma X, vendar pa so bile pridobljene celice tetraploidne in posledično neuporabne v terapevtske namene (Jaenisch in Young, 2008).

Poleg že omenjenih metod reprogramiranja je treba omeniti še inducirane pluripotentne matične celice (iPSC, *ang.* induced pluripotent stem cells), ki so jih znanstveniki (Takahashi in Yamanaka, 2006) pridobili z virusno transdukcijo kombinacije različnih genov. Po nekaj modifikacijah reprogramiranja jim je uspelo vzpostaviti celično linijo, ki

je bila izredno podobna mišjim ESC. Vendar pa je bila formacija tumorjev v iPSC himerne miši bolj pogosta napram tisti v ESC. Razlog verjetno tiči v ekspresiji c-Myc v iPSC pridobljenih iz somatskih celic (Wernig in sod., 2007).

Človeške iPSC so morfološko zelo podobne človeškim ESC in izražajo tipične celične površinske antigene ter gene specifičnih za človeške ESC kot npr. OCT4, SOX2, NANOG itd. Humane iPSC se diferencirajo v vse tri zarodne plasti celic *in vitro* ter tvorijo teratome. Prednost človeških iPSC je, da niso izolirane iz zarodkov (Thomson in sod., 1998), hkrati pa v postopku reprogramiranja obdržijo svojo pluripotentnost in imajo velik potencial terapevtske uporabe, vendar je tu odločilen razvoj novih metod, pri katerih bi moral genetski material ostati nespremenjen (Yu in Thomson, 2008).

2.3.2.2 Domnevne pluripotentne matične celice

Dolgo časa je kostni mozeg veljal za edini primarni organ, kjer so domovale krvotvorne matične celice. V zadnjem času pa velja teza, da kostni mozeg ravno tako predstavlja dom heterogeni populaciji ne-krvotvornih matičnih celic. Glede na različne znanstvene publikacije sem uvrščamo endotelijske progenitorske celice, mezenhimske matične celice, multipotentne prednice odraslega, MIAMI celice, humane multipotentne odrasle matične celice ter VSEL celice (Rtajczak in sod., 2008). Za vse te omenjene celice se domneva, da so pluripotentne, saj lahko razvijejo tkiva iz vseh treh zarodnih plasti, vendar pa te hipoteze zaradi pomanjkanja dokazov niso še povsem potrjene.

2.3.2.2.1 Endotelijske progenitorske celice

Endotelijske progenitorske celice (EPC, *ang.* endothelial progenitor cells) izvirajo iz domnevnega hemangioblasta, v mezodermu embria. Aktivnost hemangioblasta je bila demonstrirana v embrionskih telesih, tvorjenih s strani ESC v *in vitro* kulturah, vendar pa še vedno ni povsem jasno ali se hemangioblast obdrži v življenju odraslega oseba in če nasploh prebiva v odraslem kostnem mozgu (Pelosi in sod., 2002). Kostni mozeg je glavni vir EPC, ki nazadnje cirkulirajo v periferno kri z namenom obnavljanja poškodovanih endotelijev. Hkrati naj bi prispevale tudi pri angiogenezi zarodka (Ingram in sod., 2005).

2.3.2.2.2 Mezenhimske matične celice

Mezenhimske matične celice (MSC, *ang.* mesenchymal stem cells) so prvič identificirali Friedenstein in sod. (1966) pred 40 leti, tako da so jih izolirali iz kostnega mozga preko selekcije adherentne frakcije celic. Trenutno je splošno sprejeto dejstvo, da MSC prispevajo k regeneraciji mezenhismkih tkiv, kot so kosti, hrustanec, mišice, ligamenti, kite, maščevje in stroma. So esencialne za tvorbo hematopoetskega mikro-okolja, v katerem krvotvorne matične celice rastejo in se diferencirajo (Pittenger in sod., 1999).

Po mnenju Mednarodne družbe za celično terapijo (*ang.* International Society for Cellular Therapy) MSC poimenujemo tudi multipotentne mezenhimske stromalne celice zaradi

dejstva, da kulture MSC vsebujejo heterogene populacije celic in večina teh fibroblastnih celic ne dosega kriterije za biti identificirane kot matične celice (Horwitz in sod., 2005).

Izražajo mnogo površinskih markerjev, ki so uporabljeni pri njihovi izolaciji, upoštevajoč najpomembnejše: Stro-1, SB-10, SH-2, SH-3, SH-4, CD44, CD29, CD73 in CD90 (Kemp in sod., 2005). Presenetljivo je, da so odkrili tudi ekspresijo CXCR4 ter c-Met receptorjev (Waller in sod., 1995). Zadnji izsledki poročajo tudi o ekspresiji pluripotentnih označevalcev, kot so Oct-4, SSEA in Nanog, ki naj bi bila posledica prisotnosti nediferencirane primitivne populacije MSC (Battula in sod., 2007).

Največji problem pri točni fenotipizaciji MSC predstavlja analiza s pomočjo ločevalnika fluorescenčno označenih celic (FACS, *ang.* fluorescence-activated cell sorting), saj je vedno izvedena *in vivo* okolju in ne na samih celicah, ki injicirajo rast fibroblastnih kolonij. Tako ni povsem znano ali MSC izražajo CD34 marker (Waller in sod., 1995).

2.3.2.2.3 Multipotentne prednice odraslega

Multipotentne prednice odraslega (MAPC, *ang.* multipotent adult progenitor cells) so po fibroblastni morfologiji podobne MSC. Se pa predpostavlja, da so MAPC bolj primitivne od MSC; vsekakor je to hipotezo treba še bolje raziskati (Jiang in sod., 2002).

Njihovo gojenje je močno odvisno od koncentracije kisika in uporabljene sarže seruma dodanega k gojišču. To je tudi eden izmed glavnih problemov mnogih laboratorijev, saj imajo težave pri vzpostavljanju celičnih kultur MAPC (Jiang in sod., 2002).

Kolonije MAPC izražajo nizke ravni FLK-1, Sca-1 in CD90 ter višje koncentracije CD13 in SSEA-1. So pa hkrati negativne za ekspresijo CD34, CD44, CD45, CD117 ter MHC kompleksa razreda I in II (Jiang in sod., 2002).

2.3.2.2.4 MIAMI celice

MIAMI celice (*ang.* marrow-isolated adult multilineage inducible cells) so izolirali iz človeškega kostnega mozga, iz osebkov starih od 3 do 72 let. Kolonije MIAMI celic so bile gojene na fibronektinu in ob nizkih koncentracijah kisika (D'Ippolito in sod., 2004). Celice, ki so se razvile iz teh kultur, so izražale CD29, CD63, CD81, CD122, CD164, c-Met, BMPR1B (*ang.* bone morpho-genetic protein receptor 1B) in NTKR3 (*ang.* neutrophilic tyrosine kinase receptor 3). Hkrati so bile negativne za CD34, CD36, CD45, CD117 in HLA-DR (D'Ippolito in sod., 2006), izražajo pa markerja značilne za ESC in sicer Oct-4 ter Rex-1.

2.3.2.2.5 Humane multipotentne odrasle matične celice

Humane multipotentne odrasle matične celice (hMACS, *ang.* human multipotent adult stem cells) so bile izolirane iz človeških jeter, srca in kostnega mozga. Njihove kolonije izražajo pluripotentne specifične transkripcijske faktorje Oct-4, Nanog in Rex-1. Imajo visoko aktivnost telomeraz ter dosega širok diferenciacijski potencial (Beltrami in sod., 2007).

2.3.2.2.6 VSEL celice

Kucia in sod. so nekaj let nazaj (2006) uspeli izolirati zelo majhne embrionalnim matičnim celicam podobne celice (VSEL, *ang.* very small embryonic-like stem cells). Populacijo VSEL celic so pridobili iz mišjega kostnega mozga z lizo eritrocitov ter s pomočjo FACS analize na podlagi izraženega površinskega antigena Sca-1 in odsotnosti markerjev, značilnih za linijsko usmerjene celice ter površinskega antigena CD45. Izražale so pluripotentne označevalce, kot so SSEA-1, Oct-4, Nanog in Rex-1 ter telomerazni protein Rif-1.

VSEL celice kažejo tipične lastnosti embrionalnih matičnih celic, kot so majhna velikost (cca 3.5 μm v premeru), veliko jedro obdano z ozkim robom citoplazme ter vsebnost evkromatina. VSEL celice so manjše od eritrocitov in večje od večine trombocitov. Kljub njihovi majhni velikosti vsebujejo diploidno DNA ter številne mitohondrije. Ne izražajo antigenov MHC-I in HLA-DR ter so negativne za površinske označevalce CD90, CD105, CD29 (Kucia in sod., 2007).

V primeru, da gojimo VSEL celice na hranilni podlagi iz mišjih mioblastov C2C12, jih bo približno 5-10% tvorilo skupke, ki so podobni embrioidnim telescem. Ti novo nastali skupki so sestavljeni iz nezrelih celic z velikimi jedri, ki vsebujejo evkromatin in so, tako kot običajne VSEL celice, pozitivne za označevalce CXCR4 (tudi CD184), SSEA-1 ter Oct-4. Z usmerjeno diferenciacijo tvorijo celice vseh treh zarodnih plasti (Ratajczak in sod., 2008).

Lahko bi rekli, da so VSEL celice podobne primordialnim zarodnim celicam, saj izražajo iste označevalce kot so fetalna oblika alkalne fosfataze, Oct-4, SSEA-1, CXCR4, Mvh, Stella, Fragilis, Nobox ter Hdac6 in bi lahko predstavljale populacijo celic v odraslih tkivih, ki izvira iz populacije PGC (Kucia in sod., 2005).

VSEL celice so ravno tako izolirali iz človeške popkovnične krvi (CB-VSEL, *ang.* cord blood-derived VSEL) in sicer na podoben način kot mišje VSEL celice, dobili pa so populacijo, ki je bila negativna za linijske označevalce in CD45 ter pozitivna za CD133, CD34 in CXCR4.

Celice so izražale tudi transkripcijska faktorja Oct-4 in Nanog, ki sta značilna za pluripotentne matične celice ter površinski označevalec SSEA-4 (Kucia in sod., 2007). Vendar pa upodobitev teh označevalcev in razmerja med njimi niso bila sistematično raziskana, tako da fenotip človeških VSEL celic ostaja v zvezi s tem nejasen.

Dodaten dvom o natančni fenotipski karakterizaciji VSEL celic je nedavno nazaj vzpodbudila Danova-Alt in sod. (2012), kjer so s fluorescenčno *in situ* hibridizacijo (FISH, *ang.* fluorescence *in situ* hybridisation) detektirali aneuploidni kariotip VSEL celic, ki ne podpira fenotipa embrionalnih matičnih celic, niti fenotipa odraslih matičnih celic. To nakazuje, da so CB-VSEL celice neaktivna populacija, ki ni primerljiva z mišjimi VSEL celicami.

Skratka, zaradi primanjkljaja dokazov za klasično pluripotentnost je bilo predlagano, da njihova resnična fiziološka funkcija in izvor še vedno ostajata negotova, kljub potencialni vlogi pri regeneraciji ter obnovi tkiv.

Preglednica 1: Pozitivni in negativni označevalci VSEL celic

Domnevne pluripotentne matične celice	Fenotip	
	Pozitivni označevalci	Negativni označevalci
VSEL	Oct-4, Nanog, Rex-1, Rif-1, AP, c-Met, CD34, CD133, CXCR4 (CD184), SSEA-4 (humane), SSEA-1 (mišje)	CD29, CD45, CD90, CD105, Lin, MHC-I, HLA-DR

2.4 POPKOVNIČNA KRI

Popkovnična kri (PK) je kri, ki ostane v popkovini ter posteljici tik po porodu. V preteklosti so jo obravnavali kot medicinski odpadki in ji niso dajali dovolj pomena. Zadnji čas se jo uporablja kot bogat alternativni vir krvotvornih in ostalih matičnih celic, kot so neomejene somatske matične celice (USSCs, *ang.* unrestricted somatic stem cells), embrionalne matične celice popkovnične krvi (CBEs, *ang.* cord blood-derived embryonic stem cells) ter multipotente progenitorske celice popkovnične krvi (CB-MPCs, *ang.* cord blood multipotent progenitor cells) (Freshney in sod., 2007).

Dobro je znano, da celice pridobljene iz popkovnične krvi prispevajo k regeneraciji skeletnih mišic, jeter, živčnega tkiva in miokardiuma. Včasih so bili mnenja, da je za njihovo uporabo v regenerativni medicini odgovorna predvsem trans-dediferenciacija ali plastičnost krvotvornih matičnih celic, vendar pa se zadnje čase ta teorija o HSC malo preizkuša, če popolnoma drži (Kucia in sod., 2007).

2.4.1 Krvotvorne matične celice

Krvotvorne matične celice so definirane kot primitivne, nerazdeljene celice, ki so zmožne samoobnavljanja ter diferenciacije v vse tipe krvnih celic. Večina HSC izraža CD34 antigen t.j. integralni glikoprotein velikosti 90-120 kDa, katerega vloga je regulacija adhezije krvotvornih celic na stromalne celice (Freshney in sod., 2007).

Prve krvotvorne matične celice izolirane iz popkovnične krvi (CB-SC, *ang.* cord blood-stem cells) so identificirali Zhao in sod. (2006). Izražale so pomembne molekularne markerje značilne za embrionalne matične celice vključno s transkripcijskima faktorjema OCT-4 in Nanog, ter antigenoma SSEA-3 in SSEA-4. CB-SC so hkrati izražale celične antigene za krvotvorne celice, kot so CD9, CD45 in CD117, vendar so bile negativne za CD34.

Poleg karakterizacije so preučevali njihov terapevtski potencial. Izkazalo se je, da imajo CB-SC zelo nizko imunogenost in ne proliferirajo alogenskih limfocitov (Zhao in sod.,

2006). To nakazuje na majhno verjetnost zavrnitvenih reakcij pri presajanju organov ali krvotvornih matičnih celic v primeru zdravljenja hematopoetskih bolezni.

Populacije matičnih celic so ravno tako zasledili v drugih prostorih popkovine in sicer v amnionu, subamnionu, perivaskularni regiji, Whartonovi žolici, popkovni krvni žili adventia in endoteliju. Znanstveniki so ravno tako poročali o razlikah v značilnostih matičnih celic med temi predelki. Človeške matične celice pridobljene neposredno iz neokužene Whartonove žolice (hWJSCs, *ang.* human umbilical cord Wharton's jelly stem cells) ponujajo najboljšo klinično uporabnost zaradi svojih edinstvenih koristnih lastnosti. Niso sporna, lahko jih enostavno gojimo v izobilju, se proliferirajo, imajo lastnosti matičnih celic, so multipotentne, hipoimunogene in ne izzovejo tumorigeneze. Poleg naštetega naj bi imele zmožnost protirakastega delovanja (Bongso, 2013).

2.4.2 Zbiranje popkovnične krvi

Popkovnično kri se zbira v posebnih, skrbno nadziranih kontejnerjih pri nizkih temperaturah v tekočem dušiku. Ta pripomore k dolgoročnemu zamrzovanju vzorcev PK. Odvzem popkovnične krvi po porodu otroka je enostavno in ne predstavlja nikakšnega tveganja tako za mati ali njenega otroka (Presajanje tkiv ..., 2014). Ko je otrok že rojen in je popkovina že prerezana, zdravstveni tehniki zabodejo iglo v veno popkovnice in kri steče po cevki v sterilno vrečko za zbiranje PK. Sledi pregled krvi v laboratoriju in ustrezna shranitev (Darovanje popkovnične ..., 2014).

Slabost pri zbiranju popkovnične krvi predstavlja majhna vsebnost krvotvornih matičnih celic v njeni povprečni enoti. Po porodu namreč ostane v posteljici nekje od 50 do 150 mL popkovnične krvi, iz katere lahko osamimo HSC in jih uporabimo za avtologno ali alogensko zdravljenje s presaditvijo (McGuckin in sod., 2007).

Če povzamemo, popkovnična kri predstavlja enega najbolj dosegljivih virov matičnih celic pri človeku. Vzrok je v naravi odvzema vzorca PK, ki je popolnoma neinvazivna metoda in v velikem številu rojstev, kar predstavlja razmeroma veliko količino vzorcev PK. Odvzem PK je hkrati popolnoma etična in nesporna metoda za izolacijo matičnih celic. Poleg tega pa matične celice iz PK v primerjavi s tistimi iz odraslih tkiv kažejo večji proliferacijski potencial, manjšo možnost prenosa bolezni in pri alogenskih presaditvah povzročajo manj zavrnitvenih reakcij (Rožman in sod., 2007; Leeb in sod., 2010).

2.4.3 Banke popkovnične krvi

V javni banki so shranjeni samo najbolj kakovostni vzorci popkovnične krvi in so namenjeni mednarodni izmenjavi preko svetovnih registrov. Javne banke trenutno shranjujejo že več kot 500.000 enot PK, hkrati pa shranjujejo podatke o več kot 16 milijonih darovalcev. Ključni podatki za mednarodno izmenjavo enot popkovnične krvi so podatki o tipizaciji HLA ter podatki o vsebnosti krvotvornih matičnih celicah v shranjeni enoti PK, ki so namenjene za zdravljenje domačih ter tujih bolnikov, ki potrebujejo alogensko transplantacijo krvotvornih matičnih celic. S transplantacijo alogenskih celic

lahko zdravimo genske bolezni in razne oblike levkemije (Popkovnična kri ..., 2015; Rožman in sod., 2012).

Za razliko od javnih bank pa zasebne banke shranjujejo popkovnično kri za avtologno uporabo, se pravi, da pacientu vrnejo njegove lastne celice pri presaditvi avtolognih celic. Ocenujejo, da naj bi bilo v zasebnih bankah shranjenih še enkrat več enot PK kot v javnih bankah, kljub temu, da so pričakovali, da se bodo razvile hibridne banke popkovnične krvi. V primeru hibridnih bank bi popkovnično kri lahko uporabljali tako za alogensko kot avtologno presaditev, a žal zaenkrat to ostaja samo ideja (Rožman in sod., 2012).

Mnogo strokovnih in akademskih institucij ima nekolikšne zadržke glede shranjevanja avtologne popkovnične krvi. Argumenti so predvsem v trenutnem pomanjkanju kliničnih indikacij, nedorečenih standardih zbiranja in shranjevanja PK, očita pa se jim tudi nepošteno oglaševanje. Se pa ob razvoju regenerativne medicine mnenje strokovnih združenj precej spreminja in pričakuje se veliko sprememb na področju klinične uporabe matičnih celic iz popkovnične krvi (Rožman in sod., 2012).

2.5 TERAPEVTSKI POTENCIAL MATIČNIH CELIC IN IZZIVI ZA PRIHODNOST

V zadnjih letih raziskovanja terapevtskega potenciala matičnih celic so imele največji odmev matične celice izolirane iz kostnega mozga. Te naj bi igrale nekakšno vlogo v homeostazi perifernih tkiv. Med poškodbo tkiva ali stresa naj bi se sprostile iz kostnega mozga v krvni obtok ter olajšale regeneracijo poškodovanih organov (Rtajczak in sod., 2008).

Vendar pa se nekatere matične celice iz kostnega mozga, organov odraslih in zarodkov, kot npr. mezenhimske matične celice, soočajo s slabostmi invazivne izolacije, z omejenim številom celic in etično omejitvijo (Bongso, 2013). Ti izzivi so spodbudili zanimanje za študije in vrednotenje matičnih celic iz tkiv povezanih z rodnostjo kot so placenta, plodovnična tekočina, amnijska membrana in popkovina.

Medtem pa se embrionalne in inducirane pluripotentne matične celice soočajo s kliničnimi ovirami zaradi potencialne imunske zavrnitve in tumorogeneze (Bongso, 2013). Da bi rešili problem imunsko-zavrnitvenih reakcij, so razvili protokole za osebno prilagoditev tkiv bolnikom. To so dosegli s transfekcijo pacientovih somatskih celic s pluripotentnimi geni za proizvodnjo človeških induciranih pluripotentnih matičnih celic (hiPSC, *ang.* human induced pluripotent stem cells), iz katerih je bilo nato mogoče ustvariti zaželeno tkivo za pacienta za transplantacijsko terapijo. Trenutno se razvijajo virusne in nevirusne metode, vendar se na žalost kot posledica uporabe hiPSC pojavljajo epigenetske spremembe v obliki kromosomskih podvajanj in delecij (Laurent in sod., 2011).

Pri vsej medijski pozornosti, ki jo namenjajo embrionalnim matičnim celicam in induciranim pluripotentnim matičnim celicam, se pogosto pozabi, da so matične celice že desetletja v klinični uporabi. Začetek njihove uporabe lahko pripišemo transfuzijski in transplantacijski medicini, kjer že leta uporabljajo krvotvorne matične celice za zdravljenje

različnih oblik krvnih bolezni in vrst raka, stanj imunskih pomanjkljivosti ter prirojenih presnovnih motenj. Veliko odmeva na področju zdravljenja z matičnimi celicami so dosegli tudi uspešni primeri celičnih terapij pri bolezni živčevja, srca in ožilja ter genskih bolezni (Šimc in sod., 2012). Seznam bolezni, pri katerih si strokovnjaki obetajo uspešno zdravljenje s pomočjo matičnih celic, je postal tekom zadnjega desetletja zelo obširen (Slika 2).

AVTOIMUNSKÉ BOLEZNI ankilozirajoči spondilitis avtoimunska hemolitična anemija avtoimunska trombocitopenična purpura sladkorna bolezen (tip I) Goodpasturjev sindrom Gravesova bolezen Hashimotov tiroiditis miastenija gravis pemfigus vulgaris perniciozna anemija revmatska vročica spontana neplodnost krioglobulinemija revmatoidni artritis sistemski eritematozni lupus multipla skleroza	SOLIDNI TUMORJI nevroblastom rak dojke tumorji spolnih celic možganski tumorji sarkom mehkih tkiv Ewinov sarkom rak jajčnikov rak pljuč Wilmsov tumor osteosarkom rak ledvic retinoblastom	KRVNE IN IMUNSKÉ BOLEZNI mielodisplastični sindromi mieloproliferativne bolezni defekti KMC fagocitne bolezni histiocitne bolezni dedne bolezni trombocitov dedne bolezni eritrocitov dedne okvare metabolizma dedne bolezni imunskega sistema levkemije limfoproliferativne bolezni bolezni plazmatk
	BOLEZNI ŽIVČEVJA Alzheimerjeva bolezen Parkinsonova bolezen Huntingtonova bolezen bolezni motoričnega nevrona bolezni perifernega živca možganska kap poškodbe hrbtenjače	POŠKODBE opekline celjenje ran, mehkih in opornih tkiv slabo celjeni zlomi kosti
JETRNE BOLEZNI ciroza	PLEŠAVOST	BOLEZNI KOSTI prirojene bolezni kosti
BOLEZNI PLJUČ KOPB emfizem pljučna fibroza bronhopulmonalna displazija pljučna hipertenzija	SRČNO-ŽILNE BOLEZNI akutni miokardni infarkt kardiomiopatija	OČESNE BOLEZNI bolezni mrežnice makularna degeneracija kemične opekline
NEPLODNOST motena spermatogeneza in oogeneza	GENSKE BOLEZNI cistična fibroza bulozna epidermoliza	MIŠIČNE BOLEZNI mišične distrofije metabolične bolezni mišic

Slika 2: Potencialno zdravljenje bolezni s pomočjo matičnih celic (Mimeault, 2006)

Ob vsem tem, skoraj neskončnem seznamu bolezni, si medicinska stroka najbolj prizadeva uporabiti matične celice pri zdravljenju degenerativnih bolezni in travmatskih poškodb, kjer naj bi imele matične celice tudi največ potenciala. Samo preučevanje in poznavanje matičnih celic ter njihove terapevtske vloge lahko pomaga pri razumevanju rakavih bolezni, kar posledično odpira tudi možnosti za nove pristope zdravljenja teh bolezni (Šimc in sod., 2012).

Mezenhimske matične celice naj bi imele ključno vlogo pri zdravljenju glioblastoma multiformae (GBM, t.j. maligna oblika možganskega tumorja). Za uspešno zdravljenje GBM je potrebno odstraniti vse tumorske matične celice, ki predstavljajo glavni vir za

razvoj in rast tumorja. To pa žal ni možno doseči s trenutno obstoječimi metodami zdravljenja, med katerimi se najpogosteje uporablja kirurški izrez. V tem primeru predstavljajo matične celice, s poudarkom na MSC, nove nosilce za npr. ciljni vnos terapevtske učinkovine v tumor, s katerimi bi lahko izboljšali učinkovitost trenutnih protitumorskih terapij (Lah Turnšek in sod., 2013). Kljub vidnemu uspehu predkliničnih raziskav o učinkovitosti in varnosti nosilcev MSC, bo potrebno odgovoriti še na kar nekaj vprašanj glede njihove klinične uporabe. Trenutno potekajo najmanj štiri klinične študije uporabe matičnih celic za zdravljenje tumorjev (Shah, 2012).

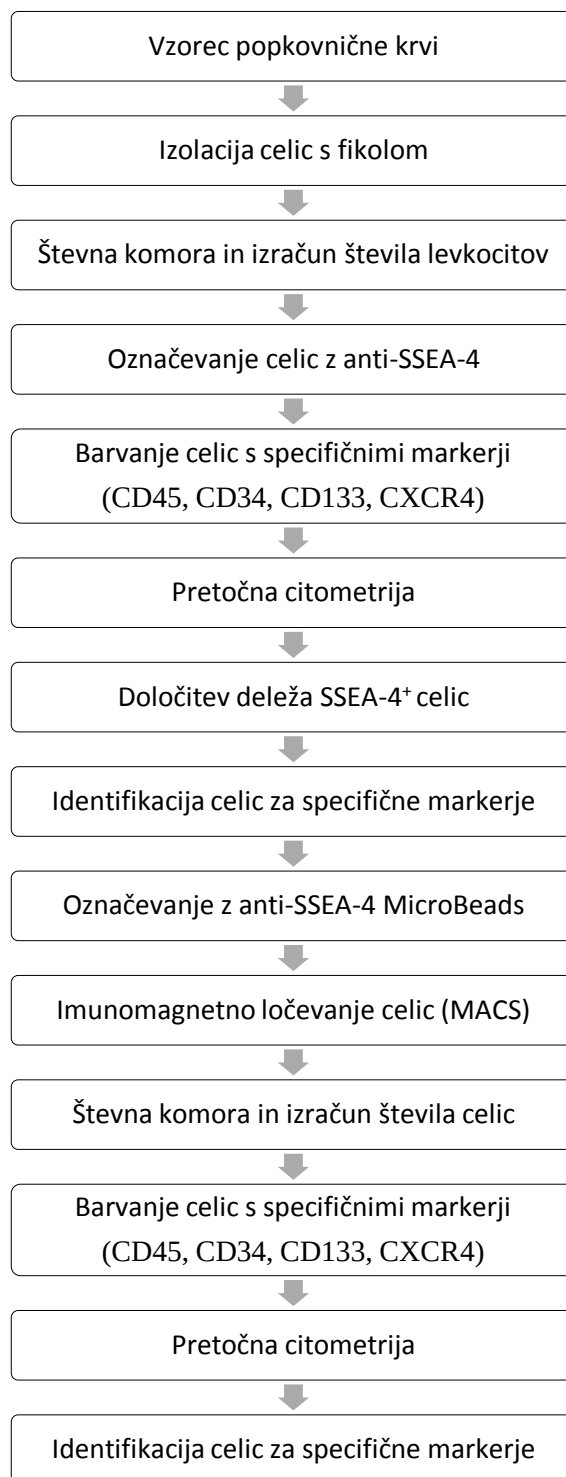
Čeprav imajo matične celice zaradi različnega celičnega mikrookolja različne fiziološke potrebe in posledično tudi različne molekularne programe, jih po vsej verjetnosti povezujejo nekatere določene genetske lastnosti, ki so skupne prav vsem. Skozi ustvarjanje transkripcijskih profilov je bilo identificiranih veliko genov v embrionalnih, krvotvornih, neuronskih in trofoblastnih matičnih celicah. Vse bolj kaže, da bomo lahko razvili molekularni prstni odtis za matične celice. Ta prstni odtis bi nam služil kot osnova za molekularno definiranje matičnih celic ter nam pomagal pri nadaljnji identifikaciji in izolaciji le-teh (Lanza in sod., 2009).

Človeštvo nenehno išče sveti gral, ki bi nas popeljal h koncu trpljenja, ki ga povzročajo bolezni in bi nam tako omogočil boljšo kakovost življenja. Nobenega dvoma ni, da je medicinska znanost trenutno usmerjena v matične celice, da zagotovijo nekaj novih mejnikov v tem pomembnem prizadevanju (Ratajczak in sod., 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA

Večino laboratorijskega dela je potekalo v laminarju, v ustreznih sterilnih pogojih.



Slika 3: Shema poteka eksperimentalnega dela

3.2 MATERIAL

Material, uporabljen pri eksperimentalnem delu, je sproti naveden v opisu metod.

3.3 METODE

3.3.1 Pridobivanje vzorcev popkovnične krvi

Vzorke popkovnične krvi smo uporabili iz javne banke ESPOK na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, ki niso ustrezali standardom za shranjevanje. V javni banki poteka zbiranje popkovnične krvi prostovoljnih darovalk. Odvzem popkovnične krvi se opravi po porodu, ko je popkovnica že prerezana in otrok rojen. Iglo zabodejo v veno popkovnice, ko je posteljica še v maternici. Kri nato steče po cevki v sterilno vrečko za zbiranje popkovnične krvi. V laboratoriju potem popkovnično kri pregledajo, obdelajo, zamrznejo in shranijo pri nizkih temperaturah v tekočem dušiku za dobo več let (Darovanje popkovnične ..., 2014).

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo preverili volumen vzorca popkovnične krvi ter celotno število levkocitov.

3.3.2 Izolacija celic s fikolom ter gradientno centrifugiranje

Vzorec popkovnične krvi smo previdno prelili v gojitveno posodico in dopolnili s fosfatnim pufrom (PBS, *ang.* Phosphate Buffered Saline). Volumen PBS je bil enak 3-kratnemu volumnu popkovnične krvi. V primeru, da smo imeli veliko začetnega volumna popkovnične krvi, smo gojitveno posodico dopolnili s PBS malo čez oznako 200 ml.

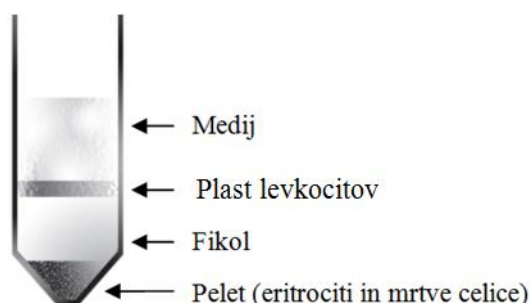
Še pred tem smo iz hladilnika vzeli pripravek Lympholyte®-H (Cedarlane Laboratories Ltd., Nizozemska) in ga za nekaj minut pustili v laminarju, da se je segrel na sobno temperaturo. Rastopina Lympholyte®-H je ločevalni medij, ki je posebej narejen za izolacijo viabilnih limfocitov ter monocitov iz človeške periferne in popkovnične krvi. Uniči eritrocite in mrtve celice ter odpravi večino granulocitov (Cedarlane Laboratories Ltd., 2013).

V centrifugirke smo s 25 ml pipeto odpipetirali po 11,5 ml fikola, ga resuspendirali z 1 ml PBS ter vsaki centrifugirki dodali po 25 ml že prej pripravljenega vzorca popkovnične krvi (resuspendiran s PBS) iz gojitvene posodice. Pri dodajanju vzorca krvi k fikolu smo morali biti izjemno pazljivi, da se fikol ter vzorec krvi v centrifugirki nista mešata. Na tak način smo lahko videli plast razmejitve, skozi katero so z vrha proti dnu pronicali eritrociti.

Ponavadi smo pripravili 4 do 8 centrifugirk, odvisno od začetnega volumna vzorčne popkovnične krvi. Sledilo je gradientno centrifugiranje pri $950 \times g$ za 15 min z zavoro 1.

Dobili smo več ločenih plasti (Slika 4), v katerih so se nahajale različne celice: na dnu so bili eritrociti ter mrtve celice, sledila je plast fikola, nato bela plast levkocitov, zgornja

plast pa je bila sestavljena iz medija (pufer, plazma, itd.). Bistvo gradientnega centrifugiranja je ločitev komponent v vzorcu glede na gostoto.



Slika 4: Plasti celic po gradientnem centrifugiranju (Cedarlane Laboratories Ltd., 2013)

S kapalko smo nato iz vsakega para centrifugirk previdno odstranili belo plast levkocitov ter jih združili v eno centrifugirko in dopolnili s PBS do oznake 50 ml. Tako smo dobili od 2 do 4 centrifugirke, ki smo jih 7 min centrifugirali pri $400 \times g$ s polno zavoro. Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant, 3-krat resuspendirali celice v prvem peletu z 10 ml PBS in nato prenesli celično suspenzijo iz prve pa vse do zadnje centrifugirke, ki smo jo na koncu znova centrifugirali ($400 \times g$, 7 min, zavora 5).

3.3.3 Števna komorica in izračun števila levkocitov

Zaradi manjšega števila celic smo njihovo število določali pod svetlobnim mikroskopom s pomočjo Bürker-Türkove števne komorice.

Najprej smo pripravili celično suspenzijo, kateri smo po zadnjem centrifugiranju odlili supernatant in celice resuspendirali v 5 ml PBS. Nato smo z mikropipeto prenesli 20 μ l celične suspenzije v luknjico na mikrotitrski plošči, kamor smo še pred tem nanесли 180 μ l barvila Tripan modro. Po nanosu razredčenih celic k barvilu smo le-te nekajkrat resuspendirali in jih pazljivo nanесли na števno komorico. Volumen razredčenih celic, ki je bil prenesen na števno komorico, je znašal 20 μ l.

Sledilo je štetje viabilnih celic pod mikroskopom ter izračun števila levkocitov po izolaciji s fikolom, kjer je faktor razredčitve predstavljal $1/10$ in volumen komorice $0,1 \text{ mm}^3$:

$$\text{št. levkocitov}_{\text{po fikolu}} = \frac{\text{št. prešteti celic}}{\text{volumen komorice} \times \text{faktor razredčitve}} \times V_{\text{cel. suspenzije}} \quad \dots(1)$$

3.3.4 Označevanje z anti-SSEA-4 ter barvanje s specifičnimi markerji

Uporabili smo posebne epruvetke za pretočno citometrijo in jih ustrezno označili. V vsako smo odpipetirali 100 μ l razredčenih celic, šestim od skupnih sedem smo dodali določen volumen posameznega markerja, v zadnjo epruvetko pa smo odpipetirali 20 μ l antigena SSEA-4 in jo označili kot SSEA-4. Za specifične označevalce smo uporabili CD45, CD34, CD133 ter CXCR4 (CD184). Obvezno smo pripravili tudi izotipsko kontrolo ter FITC in PE kontroli. Sledila je inkubacija v temnem prostoru za 15 do 20 min.

Po inkubaciji v temnem prostoru na sobni temperaturi smo sprali epruvetki s 2 ml PBS in ju dali v centrifugo za 3,5 min pri 2300 obr/min in zavori 5.

Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant, dodali epruvetkam 400 μ L pufra, jih pomešali na stresalniku in prenesli do pretočnega citometra, kjer smo odčitali delež SSEA-4⁺ celic ter delež celic, ki izražajo posamezne označevalce.

Preglednica 2: Pripravljene epruvetke za pretočno citometrijo

Št. epruvetke	Ime epruvetke	Vsebina epruvetke	Količina
1	IZO kontrola	celice	100 μ L
2	FITC kontrola	celice + CD45	100 μ L + 5 μ L
3	PE kontrola	celice + CD34	100 μ L + 5 μ L
4	marker 1	celice + CD45 + CXCR4	100 μ L + 5 μ L + 5 μ L
5	marker 2	celice + CD45 + CD34	100 μ L + 5 μ L + 5 μ L
6	marker 3	celice + CD45 + CD133	100 μ L + 5 μ L + 2 μ L
7	SSEA-4	celice + antigen SSEA-4	100 μ L + 20 μ L

3.3.5 Ločevanje celic z metodo MACS® (Miltenyi Biotec, Nemčija)

Metoda MACS® (*ang.* Magnetic-Activated Cell Sorting) je postopek imunomagnetnega ločevanja celic, ki temelji na magnetnem označevanju tarčnih celic s protitelesi, specifičnimi za določen antigen. To so t.i. superparamagnetni delci ali MicroBeads, premera 50 nm, zgrajeni iz biorazgradljivega matriksa, ki je sestavljen iz FeO ter polisaharidov, zato jih po končani separaciji ni potrebno odstraniti (Miltenyi Biotec, 2012).

Ločevanje celic poteka v kolonah z matrico, ki ob prisotnosti zunanjega magnetnega polja povzroči nastanek visoko gradientnega magnetnega polja, v katerega se ujamejo označene tarčne celice z MicroBeads, tudi tiste z minimalnim številom mikromagnetnih delcev. Neoznačene celice tako neovirano potujejo skozi kolono, označene celice pa speremo iz kolone, ko le-to odstranimo iz magnetnega polja (Miltenyi Biotec, 2012).

Za naše tarčne celice smo uporabili pozitivno selekcijo, kar pomeni, da smo jih označili z Anti-SSEA-4 MicroBeads ter na koncu izolirali želeno frakcijo, ki se je zadržala v koloni. Pri negativni selekciji pa gre za označevanje neželenih celic, ki se zadržijo na koloni, tarčne celice pa se izločijo v prvi frakciji. Negativna selekcija se uporabi v primerih, ko ne obstajajo primerna specifična protitelesa ali kadar vezana protitelesa niso primerna itd. (Miltenyi Biotec, 2012).

Pred samim pričetkom imunomagnetnega ločevanja smo si najprej pripravili pufer za MACS (0,5 % FBS), ki je vseboval 25 ml PBS ter 150 μ L FBS in smo ga ves čas neuporabe shranjevali v hladilniku. Celice smo vmes centrifugirali za 7 min pri 400 $\times$ g ter jim po končanem centrifugiranju odlili supernatant. Nato smo jim dodali cca 370 μ L pripravljenega pufra¹ in jih dobro resuspendirali (minimalno 10-krat).

¹ dodamo cca 370 μ L 0,5% FBS oz. toliko, da dobimo celokupni volumen celične suspenzije 400 μ L

Za tem smo jih 10 min inkubirali v hladilniku. Po inkubaciji smo celični suspenziji dodali Anti-SSEA-4 MicroBeads v razmerju 4:1 in jih ponovno resuspendirali z večjo mikropipeto. Sledila je ponovna inkubacija v hladilniku za 15 do 20 min. Potem smo celicam dodali 20 ml PBS, jih centrifugirali ($400 \times g$, 7 min, zavora 5), odlili supernatant in jih dobro resuspendirali v 950 μ l 0,5% FBS.

Ko smo imeli pripravljeno celično suspenzijo, smo začeli s spiranjem LD kolone in sicer tako, da smo s plastično Pasterjevo pipeto iztisnili 2 ml 0,5 % FBS ob steni kolone. Po končanem spiranju LD kolone smo nanjo z veliko mikropipeto nanесли 950 μ l celične suspenzije, kjer smo pazili, da se pri tem nismo dotaknili sten kolone. Skozi njo so nato začele prehajati neoznačene celice, LD kolono pa smo vmes še 3-krat sprali s 3 ml 0,5 % FBS in zbrali neoznačene celice v centrifugirki, ki smo jo ob koncu ločevanja zavrgli.

Sledilo je zbiranje označenih celic. To smo storili tako, da smo najprej odstranili LD kolono iz MACS separatorja in pod njo postavili novo, čisto centrifugirko. Nato smo sprali tarčne celice v koloni s Pasterjevo pipeto s 3 ml 0,5 % FBS in s plastičnim batom odplaknili označene celice v čisto centrifugirko.

Opravili smo še zadnje 4 minutno centrifugiranje pri 1700 obr/min in z 10 ml pipeto previdno odvzeli supernatant, kjer smo pazili, da nismo pri tem posesali celic na dnu centrifugirke. Dodali smo 450 μ l PBS, da smo dobili celokupni volumen celične suspenzije 500 μ l in od tega nanесли 20 μ l razredčenih celic na mikrotitrsko ploščo, kamor smo še pred tem nanесли 20 μ l barvila Tripan modro. Vse skupaj smo nato resuspendirali in previdno nanесли na Bürker-Türkovo števno komorico.

Sledilo je štetje viabilnih celic pod mikroskopom ter izračun števila celic po MACS, kjer je faktor razredčitve predstavljal 1/2 in volumen komorice 0,1 mm³:

$$\text{št. celic}_{\text{po MACS}} = \frac{\text{št. prešteti celic}}{\text{volumen komorice} \times \text{faktor razredčitve}} \times V_{\text{cel. suspenzije}} \quad \dots(2)$$

3.3.6 Identifikacija celične populacije za specifične markerje

Zadnji korak laboratorijskega dela je bila določitev deleža celic, ki izražajo specifične markerje, pridobljenih po imunomagnetni izolaciji.

Po MACS smo pridobljene celice najprej barvali z označevalci CD45, CD34, CD133 ter CXCR4. Zraven smo seveda pripravili tudi IZO, FITC in PE kontrolo. Celotna priprava epruvetk je sledila zgledu priprave epruvetk za pretočno citometrijo po izolaciji s fokolom (Tabela 2), s to razliko, da tokrat nismo označevali z antigenom SSEA-4.

Po nanosu markerjev smo epruvetke inkubirali v temnem prostoru pri sobni temperaturi za 15 do 30 min. Po končani inkubaciji smo v vsako epruvetko dodali 2 ml PBS in centrifugirali 3,5 min pri 2300 obr/min. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in jim dodali 400 μ l PBS. S pomočjo pretočne citometrije smo odčitali delež celic pridobljenih po imunomagnetnem ločevanju za označevalce CD45, CD34, CD133 ter CXCR4.

4 REZULTATI

4.1 KARAKTERISTIKE VZORCEV POPKOVNIČNE KRVİ

Vzorci popkovnične krvi, ki smo jih uporabili v diplomskem delu, so bili vzeti iz javne banke ESPOK na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino in so bili tisti vzorci PK, ki niso ustrezali standardom za shranjevanje.

Pred samim pričetkom dela smo pregledali hemogram ali krvno sliko vzorca popkovnične krvi v primeru, da bi lahko zaznali ključne karakteristike, ki vplivajo na končne rezultate ali celo na samo izvedbo eksperimenta. V Tabeli 3 so razvidne karakteristike vzorcev PK, kot so starost in začetni volumen vzorca popkovnične krvi ter koncentracija oz. število levkocitov v PK pred začetkom laboratorijskega dela.

Preglednica 3: Karakteristike vzorcev popkovnične krvi pred izolacijo s fikulom

Eksperiment	1	2	3	4	5	6	7	8
Starost popkovnične krvi	24 ur	48 ur	48 ur	24 ur	24 ur	48 ur	24 ur	48 ur
Volumen popkovnične krvi	61 ml	65 ml	70 ml	60 ml	75 ml	40 ml	75 ml	75 ml
Konc. levkocitov pred fikulom	$9,4 \times 10^6/\text{ml}$	$7,4 \times 10^6/\text{ml}$	$7,2 \times 10^6/\text{ml}$	$9,8 \times 10^6/\text{ml}$	$9,5 \times 10^6/\text{ml}$	$6,1 \times 10^6/\text{ml}$	$9,6 \times 10^6/\text{ml}$	$11,6 \times 10^6/\text{ml}$
Št. levkocitov pred fikulom	$573,4 \times 10^6$	481×10^6	504×10^6	588×10^6	$712,5 \times 10^6$	244×10^6	720×10^6	870×10^6

Ključni podatek predstavljala tudi število levkocitov pridobljivih po izolaciji s fikulom (Tabela 4), ki smo ga morali izračunati (enačba 1). Povprečna vrednost števila levkocitov znaša $89,2 \times 10^6$, s standardnim odklonom 55×10^6 , kar pomeni, da po izolaciji s fikulom lahko pričakujemo število levkocitov nekje med 34×10^6 in 144×10^6 .

Preglednica 4: Število levkocitov pridobljenih po izolaciji s fikulom

Eksperiment	1	2	3	4	5	6	7	8
Št. levkocitov po fikolu	$57,5 \times 10^6$	118×10^6	$56,5 \times 10^6$	$56,5 \times 10^6$	$212,5 \times 10^6$	48×10^6	106×10^6	$58,5 \times 10^6$

Ko primerjamo število levkocitov pred izolacijo s fikulom in po njej, opazimo večje vrednosti števila levkocitov pred izolacijo s fikulom glede na tiste po izolaciji. Manjše število levkocitov po izolaciji s fikulom je posledica delne izgube celične populacije med samim izolacijskim postopkom. Treba pa je tudi izpostaviti, da učinkovitost izolacije ni odvisna od začetne količine vzorca popkovnične krvi.

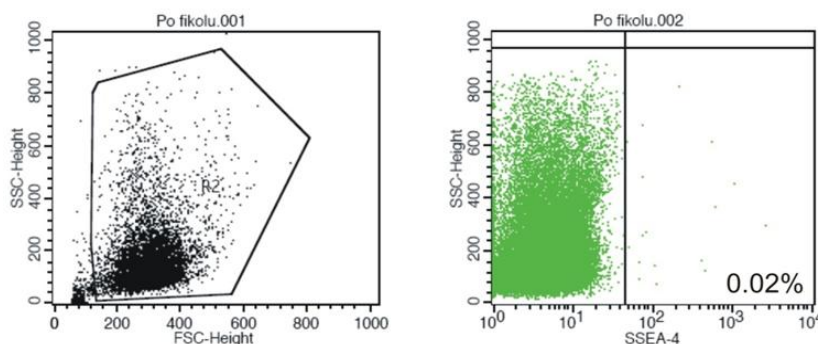
4.2 DOLOČITEV DELEŽA SSEA-4⁺ CELIC

Po izolaciji levkocitov s fikolom smo označili celice s fluorescentno konjugiranim anti-SSEA-4, da bi preverili ali se v človeški popkovnični krvi nahaja celična populacija, ki je pozitivna za antigen SSEA-4 in v kolikšnem deležu. Ta informacija nam je nadalje koristila pri odločitvi ali lahko nadaljujemo eksperiment z metodo pozitivne imunomagnetne izolacije usmerjene proti SSEA-4.

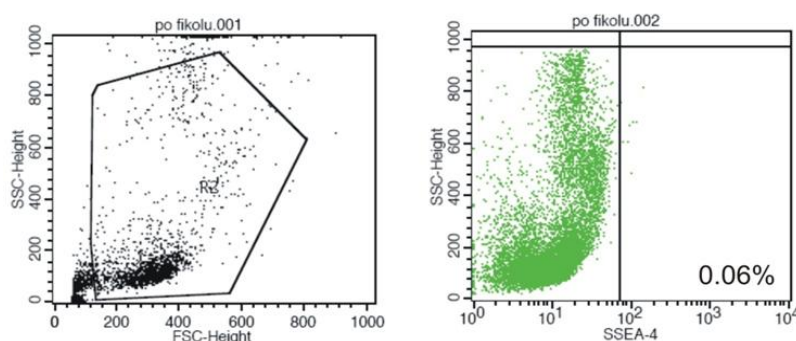
V tem primeru smo uporabili pretočno citometrijo, kjer nam sledeča grafa reprezentativnih eksperimentov (Slika 5 in 6) ponazarjata delež SSEA-4⁺ celic v vzorcih popkovnične krvi.

Na obeh grafih lahko vidimo, da smo pri analizi na pretočnem citometru zamejili celokupno levkocitno populacijo, ki je imela nizke vrednosti parametrov FSC (*ang.* Forward-scattered light) ali SSC (*ang.* Side-scattered light). FSC meri sipanje v smeri laserskega žarka in je proporcionalen velikosti celic, SSC pa meri sipanje svetlobe v pravokotni smeri glede na laserski žarek in nam poda informacijo o granularnosti oz. notranji kompleksnosti celic. Zamejili smo torej manj granulirane celice z majhno velikostjo in nato na SSC/FSC diagramu analizirali enotno označeno celično populacijo z anti-SSEA-4.

Oba ločena eksperimenta nam potrjujeta prisotnost SSEA-4⁺ celic v vzorcih popkovnične krvi, kjer eksperiment št. 1 (Slika 5) prikazuje 0,02% SSEA-4⁺ celic glede na celotno celično populacijo v vzorcu PK, eksperiment št. 2 (Slika 6) pa 0,06%.



Slika 5: Število SSEA-4⁺ celic po fikolu (Eksperiment št. 1)



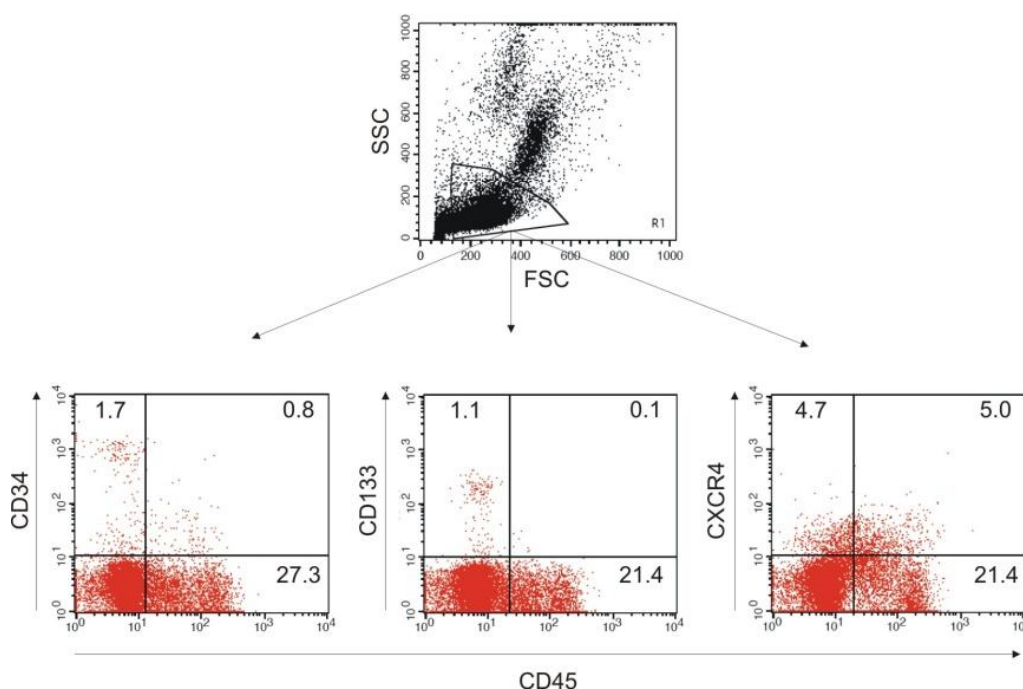
Slika 6: Število SSEA-4⁺ celic po fikolu (Eksperiment št. 2)

4.3 KARAKTERIZACIJA CELIC S POMOČJO SPECIFIČNIH OZNAČEVALCEV

4.3.1 Karakterizacija celic po izolaciji s fikulom

Po izolaciji levkocitov s fikulom smo celice barvali s specifičnimi označevalci CD45, CD34, CD133 in CXCR4 ter na pretočnem citometru odčitali delež celic, ki izražajo posamezne označevalce (Slika 7).

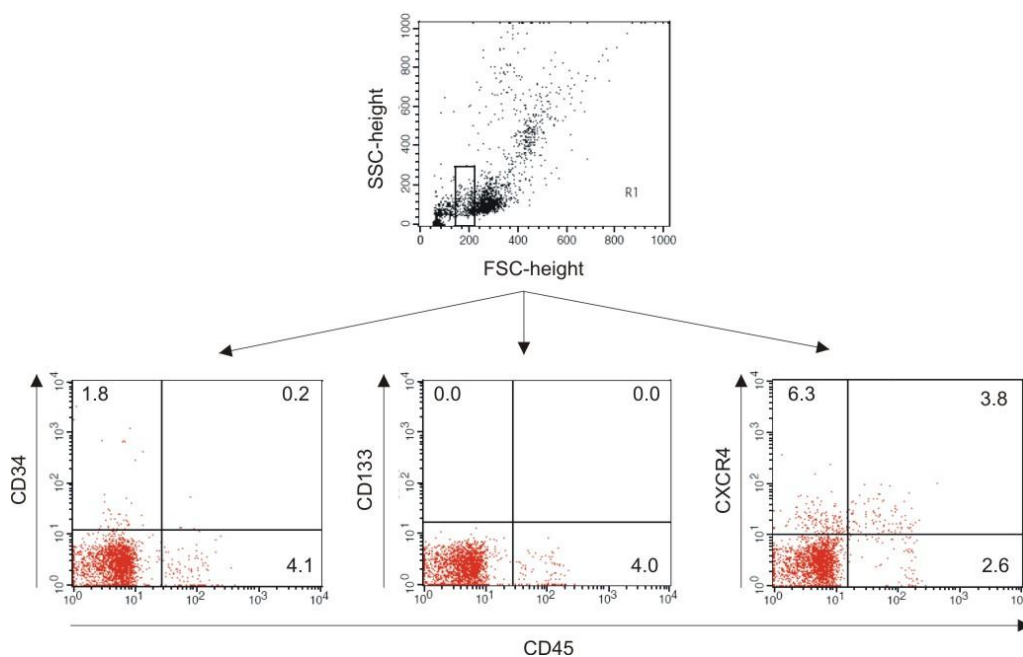
Z računalniškim programom Cell QUEST Pro, ki predeluje meritve v pretočnem citometru, smo zamejili celice, ki kažejo tipične lastnosti za domnevne pluripotentne matične celice tipa VSEL. Te značilnosti so majhna velikost (premer celice 3,5 μm) ter veliko jedro obdano z ozkim robom citoplazme, kar nakazuje na nizko stopnjo granuliranosti celice. Zaradi omenjenih morfoloških značilnosti smo potemtakem morali zajeti celično populacijo z majhnima parametroma FSC in SSC.



Slika 7: Enotna celična populacija z izraženimi označevalci po izolaciji s fikulom

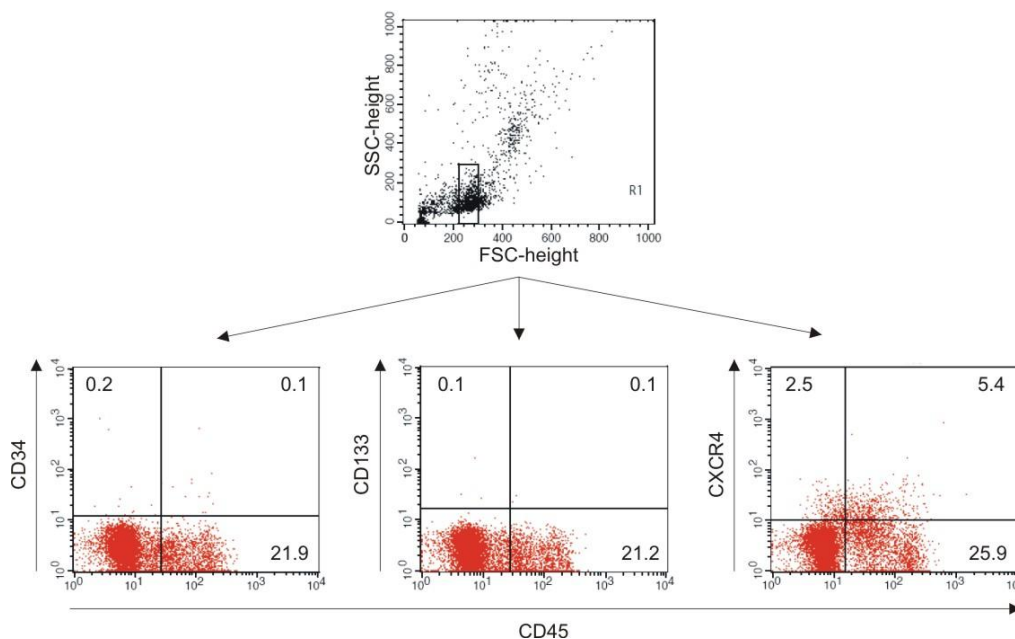
Zanimala nas je celična populacija, ki je bila negativna za CD45 ter pozitivna za CD133, CD34 in CXCR4. Iz zgornjega prikaza grafov pretočne citometrije (Slika 7) so razvidni deleži celic, ki izražajo posamezne markerje v vzorcu popkovnične krvi po izolaciji s fikulom. Prikazan je eden reprezentativen rezultat od skupaj treh neodvisnih eksperimentov. Celična populacija vsebuje 1,7% delež CD45⁻/CD34⁺ celic, 1,1% delež CD45⁻/CD133⁺ celic in 4,7% delež CD45⁻/CXCR4⁺ celic.

Isto zajeto celično populacijo smo nato analizirali še po posameznih regijah (Slika 8, 9, 10 in 11), ki so nam nudile natančnejši vpogled dejanskih deležev celičnih podtipov CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/CD133⁺ in CD45⁻/CXCR4⁺ glede na podrobnejšo analizo velikosti celic v populaciji.



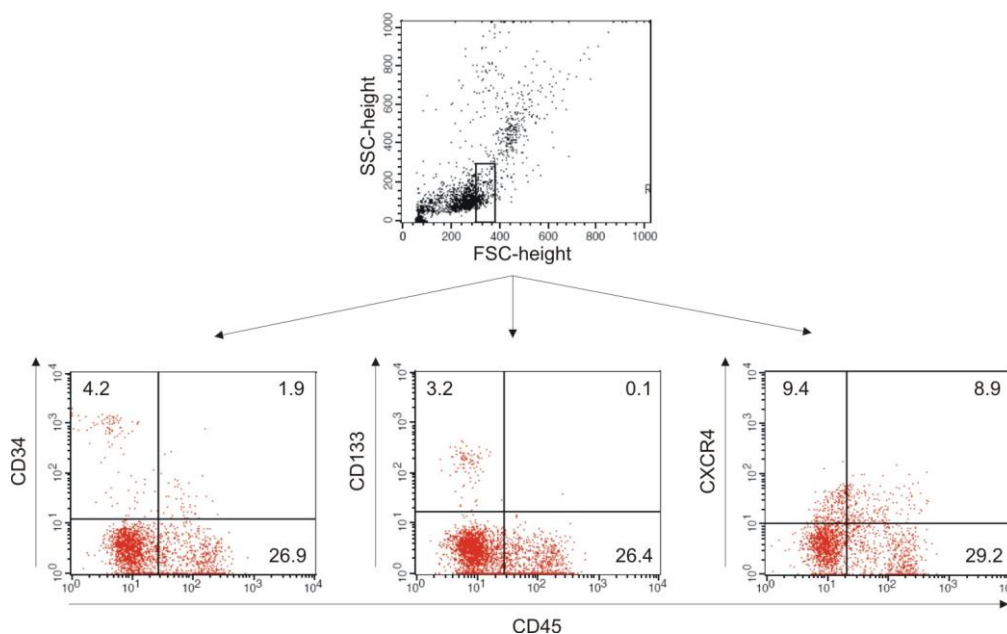
Slika 8: Celična populacija regije 1 z izraženimi označevalci po izolaciji s fikorom

Celična populacija regije 1 (najmanjša velikost) (Slika 8) vsebuje 1,8% delež $CD45^-/CD34^+$ celic, 0,0% delež $CD45^-/CD133^+$ celic in 6,3% delež $CD45^-/CXCR4^+$ celic.



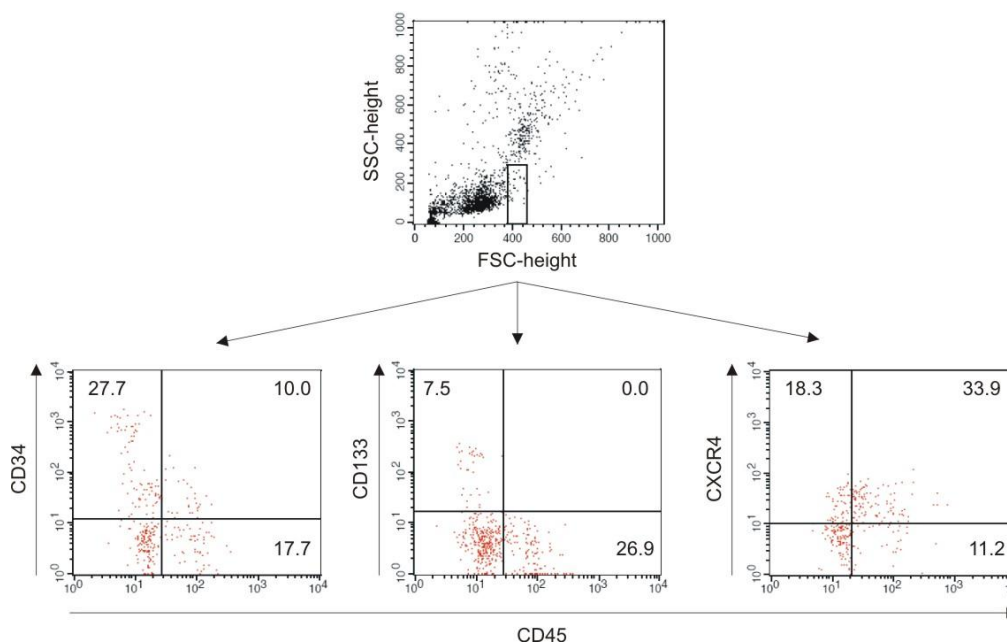
Slika 9: Celična populacija regije 2 z izraženimi označevalci po izolaciji s fikorom

Celična populacija regije 2 (Slika 9) vsebuje 0,2% delež $CD45^-/CD34^+$ celic, 0,1% delež $CD45^-/CD133^+$ celic in 2,5% delež $CD45^-/CXCR4^+$ celic.



Slika 10: Celična populacija regije 3 z izraženimi označevalci po izolaciji s fikulom

Celična populacija regije 3 (Slika 10) vsebuje 4,2% delež $CD45^-/CD34^+$ celic, 3,2% delež $CD45^-/CD133^+$ celic in 9,4% delež $CD45^-/CXCR4^+$ celic.



Slika 11: Celična populacija regije 4 z izraženimi označevalci po izolaciji s fikulom

Celična populacija regije 4 (največja velikost) (Slika 11) vsebuje 27,7% delež $CD45^-/CD34^+$ celic, 7,5% delež $CD45^-/CD133^+$ celic in 18,3% delež $CD45^-/CXCR4^+$ celic.

4.3.2 Karakterizacija celic po magnetni izolaciji

V postopku pozitivnega imunomagnetnega ločevanja smo tarčne celice označili z Anti-SSEA-4 MicroBeads ter celice izolirali v obliki frakcije, ki se je zadržala v koloni. Označene celice smo nato sprali iz kolone, ko smo le-to odstranili iz magnetnega polja.

Sledil je izračun (enačba 2) števila levkocitov pridobljenih po MACS (Tabela 5) ter karakterizacija obogatene celične populacije.

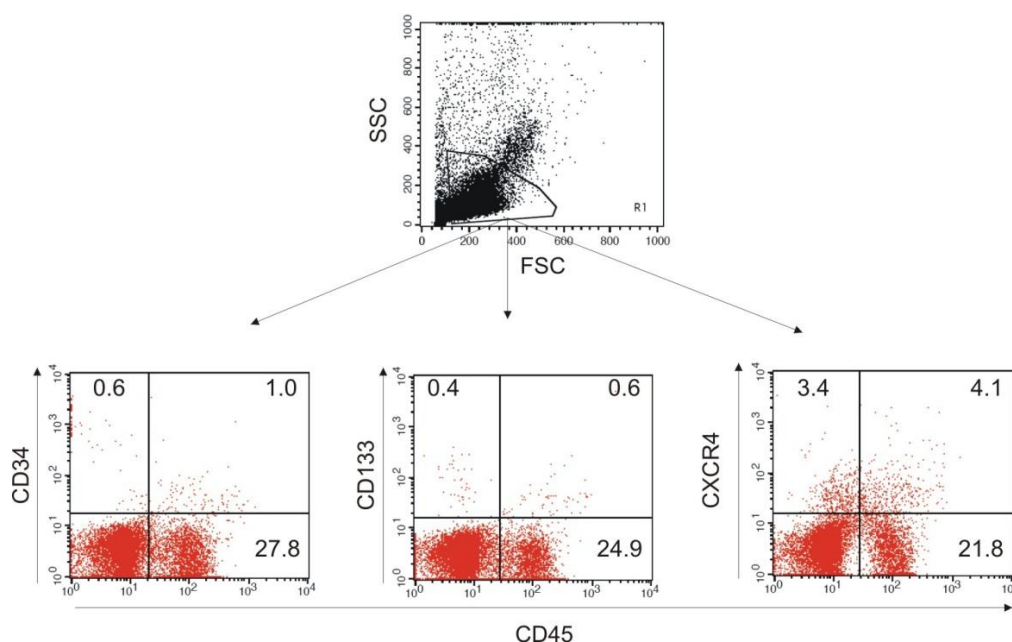
Namen fenotipske karakterizacije celične populacije, ki smo jo pridobili z imunomagnetno selekcijo usmerjeno proti antigenu SSEA-4, je preverjanje ali je le-ta obogatena v celičnih podtipih $CD45^+/CD34^+$, $CD45^+/CD133^+$ in $CD45^+/CDXCR4^+$, ki so značilni za celice VSEL. Preverjali smo tudi, če je izbrana izolacijska metoda primerna za pridobitev celične frakcije, iz katere lahko v končni fazi izoliramo VSEL celice z visoko stopnjo čistosti.

Preglednica 5: Število levkocitov pridobljenih po MACS

Eksperiment	1	2	3	4	5	6	7	8
Št. levkocitov po MACS	$0,77 \times 10^6$	$0,64 \times 10^6$	$1,34 \times 10^6$	$0,58 \times 10^6$	$2,22 \times 10^6$	$0,92 \times 10^6$	$5,16 \times 10^6$	$1,63 \times 10^6$

Povprečna vrednost števila levkocitov pridobljenih po MACS je $1,66 \times 10^6$, s standardnim odklonom $1,42 \times 10^6$. To pomeni, da se število celic, pridobljenih po imunomagnetni izolaciji usmerjeni proti SSEA-4, giblje nekje med $0,24 \times 10^6$ in $3,08 \times 10^6$.

Po MACS smo pridobljene celice nato barvali s specifičnimi označevalci. S pomočjo pretočne citometrije smo odčitali delež celic pridobljenih po imunomagnetnem ločevanju za označevalce CD45, CD34, CD133 ter CXCR4. Slika 12 prikazuje eden reprezentativen rezultat od skupaj treh neodvisnih eksperimentov.



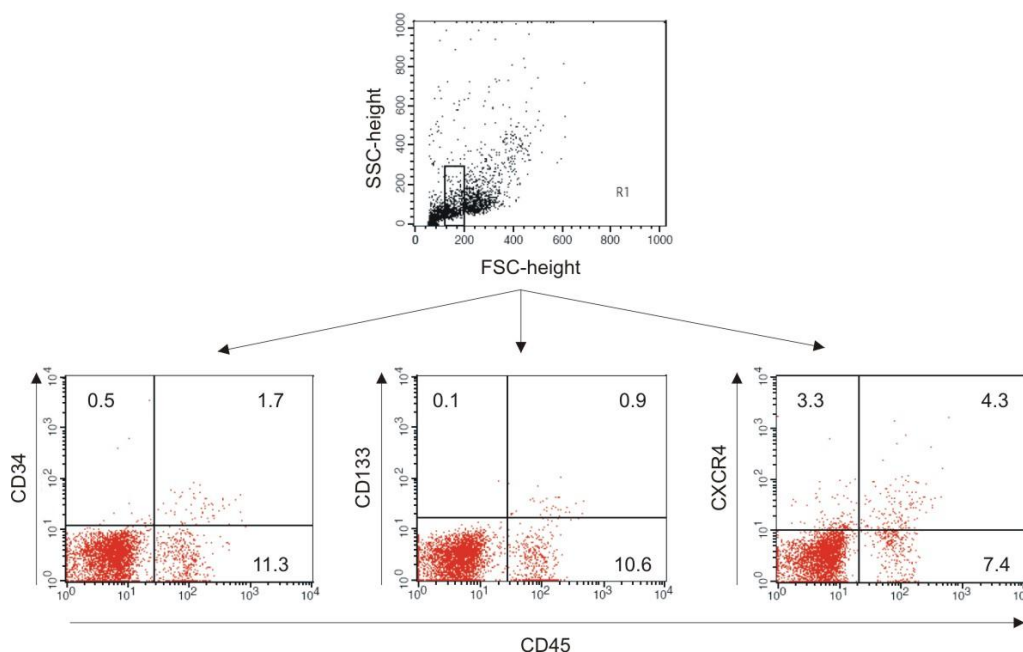
Slika 12: Enotna celična populacija z izraženimi označevalci po MACS

Analiza s pretočnim citometrom je potekala enako kot v primeru določevanja deleža celic z izraženimi specifičnimi markerji po izolaciji s fikolom. To pomeni, da smo ravno tako zamejili celično populacijo v manjših merilih parametrov FSC in SSC.

Označili smo celice, ki so bile negativne za CD45 ter pozitivne za CD133, CD34 in CXCR4. Spodnjo mejo detekcije CD45 negativnih celic smo določili na podlagi vzorcev, označenih z izotipsko kontrolo.

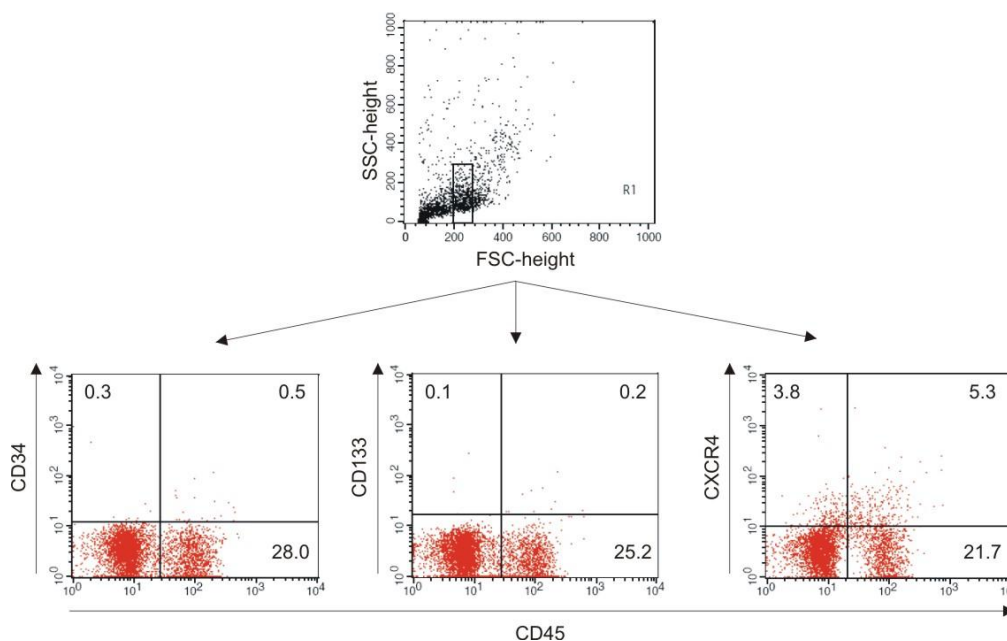
Iz točkovnega diagrama SSC/FSC (Slika 12) so razvidni deleži celic, ki izražajo posamezne markerje v vzorcu popkovnične krvi po magnetni izolaciji. Celična populacija vsebuje 0,6% delež $CD45^-/CD34^+$ celic, 0,4% delež $CD45^-/CD133^+$ celic in 3,4% delež $CD45^-/CXCR4^+$ celic.

Isto zajeto celično populacijo smo nato analizirali še po posameznih regijah (Slika 13, 14, 15 in 16), ki so nam nudile natančnejši vpogled dejanskih deležev celičnih podtipov $CD45^-/CD34^+$, $CD45^-/CD133^+$ in $CD45^-/CXCR4^+$ pridobljenih po MACS glede na velikosti celic v populaciji.



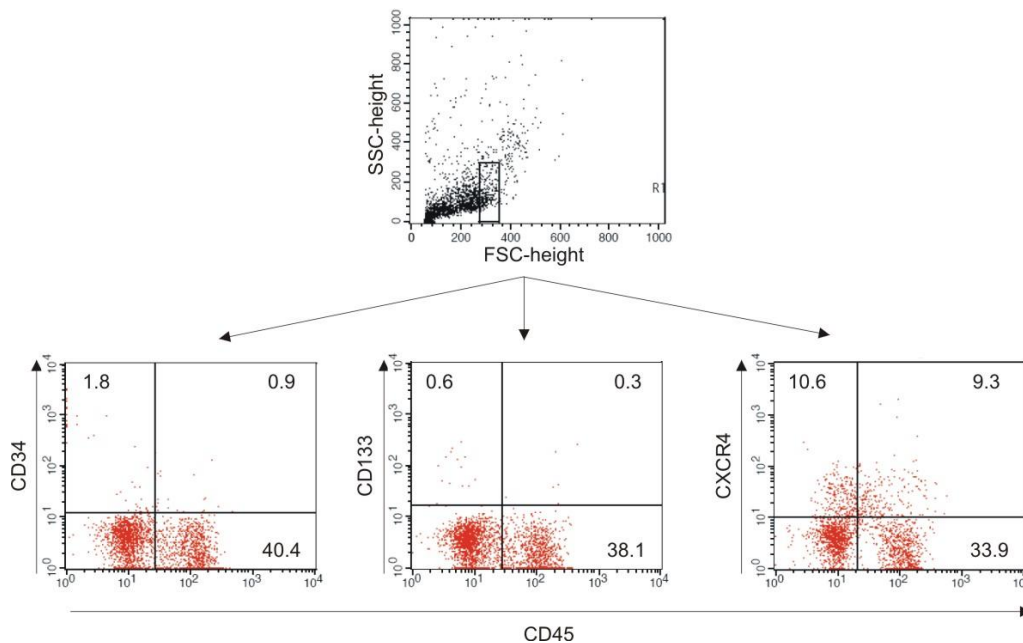
Slika 13: Celična populacija regije 1 z izraženimi označevalci po MACS

Celična populacija regije 1 (najmanjša velikost) (Slika 13) vsebuje 0,5% delež $CD45^-/CD34^+$ celic, 0,1% delež $CD45^-/CD133^+$ celic in 3,3% delež $CD45^-/CXCR4^+$ celic.



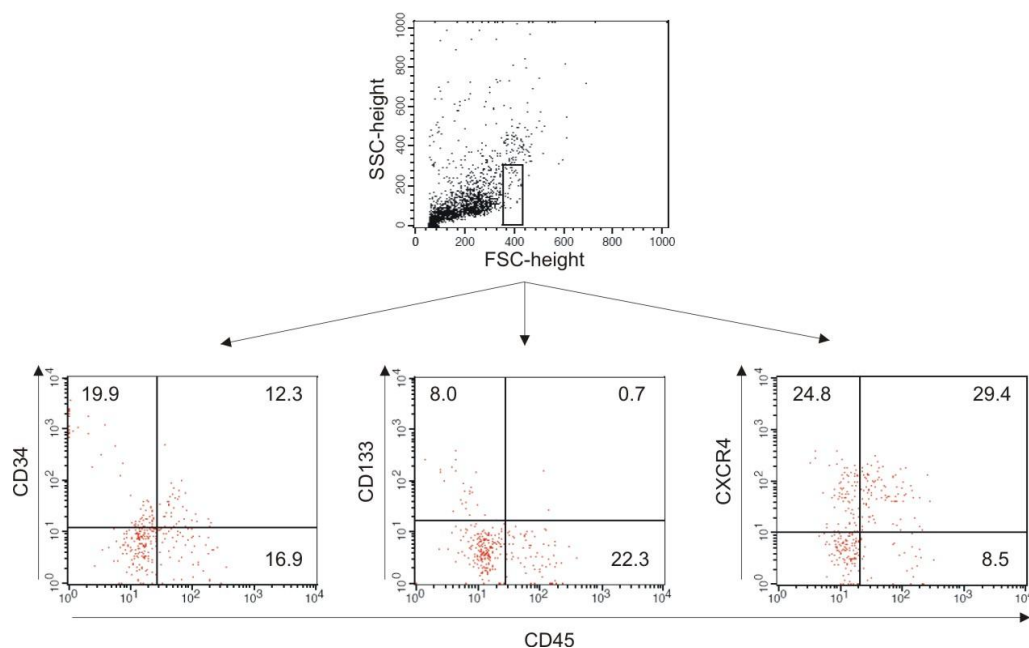
Slika 14: Celična populacija regije 2 z izraženimi označevalci po MACS

Celična populacija regije 2 (Slika 14) vsebuje 0,3% delež $CD45^{-}/CD34^{+}$ celic, 0,1% delež $CD45^{-}/CD133^{+}$ celic in 3,8% delež $CD45^{-}/CXCR4^{+}$ celic.



Slika 15: Celična populacija regije 3 z izraženimi označevalci po MACS

Celična populacija regije 3 (Slika 15) vsebuje 1,8% delež $CD45^{-}/CD34^{+}$ celic, 0,6% delež $CD45^{-}/CD133^{+}$ celic in 10,6% delež $CD45^{-}/CXCR4^{+}$ celic.



Slika 16: Celična populacija regije 4 z izraženimi označevalci po MACS

Celična populacija regije 4 (največja velikost) (Slika 16) vsebuje 19,9% delež CD45⁻/CD34⁺ celic, 8,0% delež CD45⁻/CD133⁺ celic in 24,8% delež CD45⁻/CXCR4⁺ celic.

4.3.3 Pregled rezultatov dobljenih po izolaciji s fikolom in po MACS

Celoten pregled rezultatov dobljenih po obeh metodah izolacije je predstavljen v Tabeli 6. V njej so prikazani deleži CD45⁻ celic (v %), ki izražajo posamezne označevalce tako v enotno zajeti celični populaciji, kot po posameznih regijah (R1, R2, R3 in R4) znotraj same celične populacije, ki jim lahko pravimo tudi subpopulacije.

Preglednica 6: Pridobljeni rezultati po izolaciji s fikolom ter po MACS

celice CD45 ⁺	PO FIKOLU			PO MACS		
CD34 ⁺	enotna 1,7%	R1 1,8%	R2 0,2%	enotna 0,6%	R1 0,5%	R2 0,3%
		R3 4,2%	R4 27,7%		R3 1,8%	R4 19,9%
CD133 ⁺	enotna 1,1%	R1 0,0%	R2 0,1%	enotna 0,4%	R1 0,1%	R2 0,1%
		R3 3,2%	R4 7,5%		R3 0,6%	R4 8,0%
CXCR4 ⁺	enotna 4,7%	R1 6,3%	R2 2,5%	enotna 3,4%	R1 3,3%	R2 3,8%
		R3 9,4%	R4 18,3%		R3 10,6%	R4 24,8%

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V zadnjem desetletju so najrazličnejše raziskave v tkivih odraslega človeka dokazale prisotnost matičnih celic z velikim diferenciacijskim potencialom (Bongso, 2013). Med poškodbo tkiva ali stresa naj bi se sprostile iz kostnega mozga v krvni obtok ter sprožile regeneracijo poškodovanih organov (Rtajczak in sod., 2008). Zaradi teoretično predpostavljene terapevtske vloge so pluripotentne matične celice zrelega osebk postale izredno zanimive.

VSEL celice trenutno privabljajo največ pozornosti, kar se tiče pluripotentnih matičnih celic s potencialno terapevtsko uporabnostjo. Izkazujejo tipične lastnosti embrionalnih matičnih celic, kot so majhna velikost (cca 3,5 μm v premeru), veliko jedro obdano z ozkim robom citoplazme ter vsebnost neorganiziranega evkromatina. Nahajajo se v človeški popkovnični krvi in periferni krvi ter so manjše od eritrocitov in večje od večine trombocitov. Kljub njihovi majhni velikosti vsebujejo diploidno DNA ter številne mitohondrije (Kucia in sod., 2006). VSEL celice so visoko obogatene v populaciji CD34^+ CD133^+ CXCR4^+ lin^- CD45^- mononuklearnih celic, ki ravno tako izražajo pluripotentna transkripcijska faktorja Oct-4 in Nanog ter površinski antigen SSEA-4 (Kucia in sod., 2007).

Poskusi izolacije pluripotentnih matičnih celic, kot tudi VSEL celic, se soočajo z mnogimi slabostmi, kot so invazivne tehnike, nizko število pridobljenih celic ter omejitev iz etičnega vidika (Bongso, 2013). Posledično si mnogo znanstvenikov prizadeva odkriti t.i. "zlati standard" med obstoječimi izolacijskimi pristopi za pridobitev teh pomembnih celic.

Do sedaj sta raziskana in uporabljena dva izolacijska protokola za pridobivanje VSEL celic iz popkovnične krvi. Dvo-stopenjska izolacijska metoda, kjer odstranimo eritrocite s hipotonično lizo v kombinaciji z multiparametrskim FACS ločevanjem (Kucia in sod., 2007; Halasa in sod., 2008) ter tro-stopenjska metoda, ki ima enak postopek odstranitve eritrocitov, a se nato nadaljuje z imunomagnetno selekcijo in zaključí s čiščenjem celic s FACS (Zuba-Surma in sod., 2010).

V našem primeru smo si ravno tako zastavili dvo-stopenjski izolacijski protokol, s to razliko, da smo ločili eritrocite od mononuklearnih celic s Ficoll-Paque centrifugiranjem. Nadaljevali smo z imunomagnetno izolacijo, ki je v primerjavi s protokolom Zuba-Surme in sod. imela to novost, da je bila usmerjena proti antigenu SSEA-4.

Poglavitni namen naše študije je pravzaprav bila preučitev te imunomagnetne selekcije kot ustrezne izolacijske metode za pridobitev obogatene celične populacije, s karakteristikami VSEL celic, iz vzorca popkovnične krvi. Želeli smo pridobiti celično populacijo, ki bi bila po fenotipski karakterizaciji obogatena v podtipih $\text{CD45}^-/\text{CD34}^+$, $\text{CD45}^-/\text{CD133}^+$ in $\text{CD45}^-/\text{CXCR4}^+$, za katere se smatra, da so značilni za VSEL celice (Kucia in sod., 2007; Zuba-Surma in sod., 2010).

Ravno tako smo želeli preveriti ali je metoda pozitivne imunomagnetne selekcije usmerjene proti antigenu SSEA-4 primerna za pridobitev celične frakcije, iz katere lahko nadaljnje izoliramo VSEL celice visoke čistosti.

5.1.1 Vzorci popkovnične krvi

Za biološki vir vrednotenja celične populacije s karakteristikami VSEL celic smo izbrali popkovnično kri, ki predstavlja enega najbolj dosegljivih virov matičnih celic pri človeku (Leeb in sod., 2010).

Uporablja se jo kot bogat alternativni vir krvotvornih in ostalih matičnih celic, kot so neomejene somatske matične celice, embrionalne matične celice popkovnične krvi ter multipotente progenitorske celice popkovnične krvi (Freshney in sod., 2007). Ravno tako so v popkovnični krvi dokazali prisotnost VSEL celic (Kucia in sod., 2006).

Način odvzema krvi je popolnoma neinvaziven, zaradi velikega števila rojstev je vzorec na voljo v razmeroma velikih količinah in iz etičnega vidika je odvzem PK popolnoma nesporna metoda (Rožman in sod., 2007). Popkovnično kri lahko zamrznemo in dolgotrajno shranjujemo v posebnih skrbno nadziranih kontejnerjih, ki vsebujejo tekoči dušik (Presajanje tkiv ..., 2014). Poleg tega pa matične celice iz PK v primerjavi s tistimi iz odraslih tkiv kažejo večji proliferacijski potencial, manjšo možnost prenosa bolezni in pri alogenskih presaditvah povzročajo manj zavrnitvenih reakcij (Leeb in sod., 2010; Rožman in sod., 2007).

Žal pa povprečna enota popkovnične krvi vsebuje razmeroma malo krvotvornih matičnih celic. V posteljici po porodu navadno ostane 50 – 150 ml PK, iz katere lahko osamimo HSC (McGuckin in sod., 2007). V našem primeru smo imeli delovni volumen PK med 40 in 75 ml (Tabela 3), Halasa in sod. pa so delali celo z manjšimi volumni PK, nekje med 10 in 60 ml.

Kri so v roku 48-ih ur po odvzemu iz popkovine in placente shranili pri 4°C pred samim začetkom laboratorijskega dela. Tudi sami smo delali z vzorci PK, ki so bili ustrezno shranjeni za maksimalno dva dni od časa poroda, saj je višja starost popkovnične krvi lahko problematična, zlasti pri imunomagnetni izolaciji. Pri ločevanju celic na koloni lahko pride do zamašitve le-te, saj se pri daljšem shranjevanju vzorcev PK začnejo tvoriti t.i. nitke, zaradi katerih so celice bolj zlepljene. V tem primeru je skoraj nemogoče nadaljevati z eksperimentom.

Zanimiva podatka predstavljata tudi število levkocitov po obdelavi popkovnične krvi in število levkocitov pridobljenih po izolaciji s fikorom. Število levkocitov pred izolacijo s fikorom variira med 244×10^6 in 870×10^6 (Tabela 3), število levkocitov pridobljenih po Ficoll-Paque centrifugiranjem pa je nekje od 48×10^6 do $212,5 \times 10^6$ (Tabela 4).

Ko primerjamo število levkocitov pred izolacijo s fikorom in po njej, opazimo večje vrednosti števila levkocitov pred izolacijo s fikorom glede na tiste po izolaciji. Manjše število levkocitov po izolaciji s fikorom je posledica delne izgube celične populacije

(granulocitov) med samim izolacijskim postopkom. Treba pa je tudi izpostaviti, da učinkovitost izolacije ni odvisna od začetnega volumna vzorca popkovnične krvi.

V študiji Mahantappa in sod. (2008), kjer so iskali kakršnokoli povezavo števila matičnih celic popkovnične krvi z začetnim volumnom PK ter celokupnim številom levkocitov, niso potrdili korelacije med preučevanimi spremenljivkami. Ta ugotovitev ima pomembno vlogo pri odločanju, ali so vzorci PK primeri oz. neprimerni za shranjevanje v krvnih bankah. Želeli so opozoriti na nepomembnost upoštevanja količine PK ter izpostaviti kot dejansko pomembno predpostavko odločanja število $CD34^+$ matičnih celic.

Po obdelavi popkovnične krvi, v roku 24 ur po porodu, so pridobili število levkocitov med 26×10^6 in 1797×10^6 . Glede na njihovo pridobljeno število levkocitov lahko trdimo, da naši dobljeni podatki o številu levkocitov pred izolacijo s ficolom, prikazani v Tabeli 3, sovpadajo v okvir njihovih rezultatov.

5.1.2 Izolacija s ficolom ter delež SSEA-4⁺ celic

Ločitev eritrocitov od mononukleranih celic smo dosegli s Ficoll-Paque centrifugiranjem. Po izolaciji s ficolom dobimo manjše število levkocitov (Tabela 4) glede na število celic pred izolacijo (Tabela 3).

Iz Tabele 4 je razvidno, da število levkocitov po ficolni izolaciji variira med 48×10^6 in $212,5 \times 10^6$. Povprečna vrednost števila MNC po večih izolacijah pa znaša $89,2 \pm 55 \times 10^6$. V primeru izolacije MNC iz popkovnične krvi s ficolom lahko glede na odklon od povprečne vrednosti pričakujemo število levkocitov nekje med 34×10^6 in 114×10^6 .

Za izolacijo MNC iz popkovnične krvi s ficolom smo se odločili predvsem zaradi njegove manjše agresivnosti za celice in ker smo verjeli, da bo ficol manj vplival na delikatno analizo nizko-številnih SSEA-4⁺ celic. Raziskava Bossuyt in sod. (1997) kaže, da imajo kemijske metode, ki se uporabljajo za lizo rdečih krvničk, očiten vpliv na imunofenotipizacijo in se zdi, da je metoda gradientnega centrifugiranja na fikolu bolj primerna za določene primere.

Komercialni lizni reagenti lahko vplivajo na fizikalne lastnosti razpršitve svetlobe pri pretočnem citometru ter na intenzivnost fluorescence pri barvanju z neposredno konjugiranimi monoklonskimi protitelesi. Poleg občutljivosti različnih liznih reagentov lahko sama liza eritrocitov pod določenimi okoliščinami vpliva na kvantifikacijo izbranih podskupin levkocitov (Bossuyt in sod., 1997).

Glede na primerjavo hipotonične lize s ficolno izolacijo velja ugotovitev, da se s slednjo izgubi precejšen del celične populacije. Kljub temu pa lahko trdimo, da Halasa in sod. z uporabo raztopine amonijevega klorida niso dobili znatno večjega števila levkocitov v primerjavi z našim izolacijskim postopkom. Naše število izoliranih levkocitov se giba med 48×10^6 in $212,5 \times 10^6$, njihovo število pa med 100×10^6 in 300×10^6 . Število MNC dobljenih po lizi eritrocitov se odraža predvsem v številu linijsko diferenciranih celic, saj

se pri lizi ne znebimo granulocitov, ki pa jih z gradientnim centrifugiranjem uspešno odstranimo (Zuba-Surma in sod., 2010).

Eden izmed dodatnih razlogov zakaj smo se odločili za izolacijo levkocitov s fikolom je tudi ta, da v primeru lize eritrocitov dobimo večje število celic, za katere pa porabimo več protiteles in posledično tudi več časa za samo izvedbo (Zuba-Surma in sod., 2010).

Po izolaciji levkocitov s fikolom je sledila identifikacija celične populacije za markerje, ki so značilni za VSEL celice. Te izražajo površinske označevalce CD34, CD133 in CXCR4 ter ne izražajo označevalcev značilnih za linijsko usmerjene celice (Lin: CD19, CD2, CD3, CD14, CD66b, CD24, CD16, CD56, CD235a) in skupnega označevalca vseh levkocitov (CD45) (Kucia in sod., 2007).

Celice smo zatorej barvali s specifičnimi označevalci CD45, CD34, CD133 in CXCR4 ter na pretočnem citometru odčitali delež celic, ki izražajo posamezne markerje po izolaciji s fikolom (Slika 7, spodnji trije diagrami).

Na pretočnem citometru smo zamejili celično populacijo z majhnima parametroma FSC in SSC (Slika 7, zgornji diagram). Tako smo zajeli celice, ki kažejo tipične lastnosti za domnevne pluripotentne matične celice tipa VSEL. Te značilnosti so majhna velikost (premer celice 3,5 μm) ter veliko jedro obdano z ozkim robom citoplazme, kar nakazuje na nizko stopnjo granuliranosti celice (Kucia in sod., 2007).

Nas je zanimala celična populacija, ki je bila negativna za CD45 ter pozitivna za CD34, CD133 in CXCR4. Z označevalci linijsko usmerjenih celic nismo barvali zaradi omejene količine razpoložljive mešanice protiteles za linijsko selekcijo. Poleg tega pa smo se v naši študiji osredotočili na omenjene označevalce predvsem zaradi tega, ker le-ti širše definirajo populacijo VSEL celic, ki predstavljajo naše jedro preučevanja.

Glede na primerjavo hipotonične lize s fikolno izolacijo velja ugotovitev, da se s slednjo zaradi velike specifične gostote VSEL celic le-teh izgubi več. VSEL celice v popkovnični krvi predstavljajo le 0,04% vseh jedrnih celic, po izolaciji s fikolom pa pride še do polovične izgube njihove začetne količine (Zuba-Surma in sod., 2010). Ob vseh upoštevanih poročilih lahko iz vzorca z volumnom med 50 in 100 ml izoliramo od 10 do 20 tisoč VSEL celic (Zuba-Surma in sod., 2010).

Zuba-Surma in sod. so izolirali MNC tako s hipotonično lizo kot s Ficoll-Paque centrifugiranjem. Podatki pretočne citometrije so pokazali, da se vse tri subpopulacije CD45⁻ Lin⁻ celic kaj bistveno ne razlikujejo v odstotkih. V njihovi študiji CD45⁻/CD34⁺ celice predstavljajo okoli 0,045% izoliranih celic po fikolu, dočim se naše odražajo v 1,7% celotne populacije levkocitov, kar je lepo vidno iz grafa (Slika 7, spodnji levi diagram). Naš rezultat se konec koncev nekoliko bolj sklada s podatki raziskovanja Danove-Alt in sod., saj njihova študija narekuje 1,2-odstotni delež CD45⁻/Lin⁻/CD34⁺ celic. Kljub temu pa je treba omeniti, da so študijo zaključili s sklepom, da VSEL celice v končni fazi niso pozitivne za CD34, enako so trdili za označevalec CD133.

Najbolj primitivna populacija med CB-VSEL so tiste, ki izražajo CD133 in so CD45⁻ Lin⁻, saj so najmanjše, imajo največje razmerje med površino jedra in površino citoplazme ter najbolj izražajo pluripotentne označevalce (Oct-4, Nanog in SSEA-4). Predstavljajo okoli 0,010% vseh celic z jedrom po izolacijski metodi z uporabo fikola (Zuba-Surma in sod., 2010). V primerjavi s študijo Danove-Alt in sod. se je naš 1,1 odstotek CD45⁻/CD133⁺ celic malo bolj približal njihovim izsledkom, kjer so dobili 1,8% CD45⁻/Lin⁻/CD133⁺ celic.

V vzorcih smo izmerili 4,7% CD45⁻/CXCR4⁺ podtipa VSEL celic. Glede na dobljeni rezultat lahko trdimo, da ni skladen s podatki iz literature (Zuba-Surma in sod., 2010), kjer dotična subpopulacija obsega samo 0,022% celotne populacije levkocitov. Ko primerjamo naše preostale rezultate z našimi pričakovanji, lahko ravno tako trdimo, da deleži CD45⁻/CD34⁺ in CD45⁻/CD133⁺ celic niso podobni odstotkom navedenim v literaturi (Zuba-Surma in sod., 2010).

Isto zajeto celično populacijo dobljeno po Ficoll-Paque centrifigiranju smo nato analizirali še po posameznih regijah, ki so nam nudile natančnejši vpogled dejanskih deležev celičnih podtipov CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/CD133⁺ in CD45⁻/CXCR4⁺ s pomočjo analize velikosti celic v populaciji.

Celično populacijo smo razdelili na štiri regije, ki predstavljajo štiri različne velikosti celic. Celična populacija regije 1 (Slika 8) zaobjema celice z najmanjšo velikostjo. Vsebuje 1,8% CD45⁻/CD34⁺, 0,0% CD45⁻/CD133⁺ in 6,3% CD45⁻/CXCR4⁺ celic. Če podrobno preučimo vse tri podtipa VSEL celic, lahko vidimo, da so CD45⁻/CD133⁺ celice (Slika 8, spodnji srednji diagram) v regiji 1 najmanjše velikosti in jih posledično v tem območju diagrama ni moč zaznati. Ta podatek se načeloma dovolj ujema s tistimi iz preteklih študij (Danova-Alt in sod., 2012; Zuba-Surma in sod., 2010), kjer naj bi te celice predstavljale izredno majhen delež celotne populacije enojedrnih celic in sicer tam okoli 0,010% (Zuba-Surma in sod., 2010).

Regija 2 (Slika 9) predstavlja populacijo celic, ki so po velikosti druge najmanjše. Delež CD45⁻/CD34⁺ celic je 0,2%, CD45⁻/CD133⁺ celice zajemajo 0,1% celotne celične populacije, CD45⁻/CXCR4⁺ celice pa 2,5%. Regija 3 (Slika 10) vključuje celice, ki so druge največje po velikosti, in vsebuje 4,2% CD45⁻/CD34⁺, 3,2% CD45⁻/CD133⁺ in 9,4% CD45⁻/CXCR4⁺ celic. Z zadnjo regijo (Slika 11) smo zamejili celice z največjo velikostjo in deleži celičnih podtipov v tej regiji tudi višji od tistih pri regiji 1, 2 in 3, kar je razvidno iz Tabele 6. Celična populacija regije 4 vsebuje 27,7% CD45⁻/CD34⁺, 7,5% CD45⁻/CD133⁺ in 18,3% CD45⁻/CXCR4⁺ celic.

Celice pridobljene po izolaciji s fikolom smo nato označili še z anti-SSEA-4, da bi preverili našo prvo postavljeno hipotezo, ali se v človeški popkovnični krvi nahaja celična populacija, ki je pozitivna za antigen SSEA-4. Informacija o prisotnosti SSEA-4⁺ celic je seveda osnova za SSEA-4 pogojeno magnetno selekcijo in nam da vedeti, ali lahko nadaljujemo eksperiment z izbrano izolacijsko metodo.

Antigen SSEA-4 je značilno izražen na nediferenciranih človeških embrionalnih matičnih celicah, induciranih pluripotentnih celicah, embrionalnih karcinomskih celicah in embrionalnih zarodnih celicah, kakor tudi na različnih somatskih matičnih celicah (npr. matične celice zobne pulpe), mezenhimskih matičnih celicah in tudi na VSEL celicah (Miltenyi Biotec, 2012).

Označevanje z anti-SSEA-4 ter analiza SSEA-4⁺ celic na pretočnem citometru sta bila silno težavna zaradi izredno nizkega števila dobljenih celic, zato je bila uporaba izotipskih kontrol ključnega pomena. Izotipska kontrola je vrsta negativne kontrole zasnovana za merjenje ravni nespecifičnega ozadja signala, povzročenega s strani primarnih protiteles, ki temeljijo na vrsti tkiva preiskovanega vzorca. Njena vloga je izključitev signalov teh nespecifični vezav in pridobitev pravega signala opazovanega barvanja in ne artefakta.

Z uporabo pretočne citometrije smo izmerili delež SSEA-4⁺ celic v vzorcih popkovnične krvi po izolaciji s ficolom. Slika 5 in Slika 6 nam predstavljata grafa reprezentativnih eksperimentov, kjer se vidi, da smo pri analizi na pretočnem citometru zamejili celokupno levkocitno populacijo, ki je imela nizke vrednosti parametrov FSC ter SSC. Parametra sta morala biti po vrednostih majhna, saj smo preučevali manj granularane celice z majhno velikostjo, ki so po besedah Kucie in sod. (2007) tipične lastnosti VSEL celic.

Eksperiment št. 1 (Slika 5, diagram desno) prikazuje 0,02% delež SSEA-4⁺ celic po izolaciji s ficolom, eksperiment št. 2 (Slika 6, diagram desno) pa 0,06% delež SSEA-4⁺ celic. Da VSEL celice izražajo markerje značilne za pluripotentne matične celice, so l. 2007 dokazali že Kucia in sod. Nedavno nazaj pa so z ISS (*ang.* ImageStream system) tehnologijo karakterizirali celično populacijo iz vzorca popkovnične krvi, ki je izražala površinski označevalec embrionalnih matičnih celic SSEA-4. Ta celična populacija se je izkazala za eno izmed redkih v celotni levkocitni populaciji in sicer se je odražala v 0,016%. Celice so bile po velikosti najmanjše v populaciji in so zajemale največji delež celične populacije, ki so bile manjše od 6 μ m (Zuba-Surma in sod., 2010).

Oba ločena eksperimenta nam s svojim SSC/FSC diagramom potrjujeta prvo hipotezo, da se v človeški popkovnični krvi nahaja celična populacija, ki je pozitivna za antigen SSEA-4. Na podlagi te ugotovitve smo lahko nadaljevali s postopkom pozitivne imunomagnetne selekcije usmerjene proti antigenu SSEA-4.

5.1.3 MACS in primerjava rezultatov po obeh izolacijah

Metoda MACS® je postopek imunomagnetnega ločevanja celic, ki temelji na magnetnem označevanju tarčnih celic s protitelesi, specifičnimi za določen antigen. Celice označujemo z Anti-SSEA-4 mikromagnetni delci (*ang.* Anti-SSEA-4 MicroBeads), ki so bili razviti za ločevanje celic glede na prisotnost ogljikohidratnega epitopa SSEA-4. Ti magnetni delci so zgrajeni iz biorazgradljivega matriksa in jih zato po končani separaciji ni potrebno odstraniti (Miltenyi Biotec, 2012).

V primerjavi s protokolom Zuba-Surme in sod. je imela naša izolacijska metoda to novost, da je bila usmerjena proti antigenu SSEA-4. Selekcija je bila pozitivna, kar pomeni, da smo celice označili z Anti-SSEA-4 MicroBeads ter izolirali frakcijo, ki se je zadržala v koloni.

S postopkom pozitivne imunomagnetne selekcije usmerjene proti antigenu SSEA-4 smo želeli pridobiti celično populacijo, ki je po fenotipski karakterizaciji obogatena v podtipih $CD45^-/CD34^+$, $CD45^-/CD133^+$ in $CD45^-/CXCR4^+$, za katere se smatra, da so značilni za VSEL celice (Kucia in sod., 2007; Zuba-Surma in sod., 2010).

Drugi namen našega raziskovanja pa je bila preučitev, ali je metoda pozitivne imunomagnetne selekcije usmerjena proti antigenu SSEA-4 primerna za potencialno nadaljnjo ločevanje s tehniko FACS. Zanimalo nas je, ali lahko z izbrano MACS metodo pridobimo celično frakcijo, iz katere lahko nadaljnje izoliramo VSEL celice visoke čistosti.

Še predno smo se lotili barvanja celic s specifičnimi markerji, smo po imunomagnetnem ločevanju izračunali število pridobljenih levkocitov (Tabela 5). Število levkocitov po imunomagnetni izolaciji variira med $0,58 \times 10^6$ in $5,16 \times 10^6$. Povprečna vrednost števila levkocitov po večih poskusih izolacij znaša $1,66 \pm 1,42 \times 10^6$. V primeru označevanja celic z magnetki ter njihove separacije v magnetnem polju lahko pričakujemo pridobljeno število levkocitov nekje med $0,24 \times 10^6$ in $3,08 \times 10^6$.

V primerjavi števila levkocitov po izolaciji s fikorom (Tabela 4) s številom celic po imunomagnetni izolaciji (Tabela 5) opazimo večje vrednosti števila levkocitov pred samo metodo MACS. Rezultati nakazujejo na logičen proces izgube dela celične populacije po izvedbi imunomagnetne izolacije.

Po MACS je sledila fenotipska karakterizacija celične populacije. Označili smo vse celice in sicer z označevalci CD45, CD133, CD34 ter CXCR4. Na pretočnem citometru smo odčitali delež celičnih podtipov, ki so značilni za VSEL celice. Analiza vzorcev na pretočnem citometru je potekala enako kot pri vzorcih dobljenih po izolaciji s fikorom. To pomeni, da smo zamejili celično populacijo z majhnima vrednostima FSC in SSC parametrov (Slika 12, zgornji diagram).

Iz grafov pretočne citometrije (Slika 12, spodnji trije diagrami) so razvidni deleži celic, ki izražajo posamezne specifične označevalce v vzorcu popkovnične krvi po magnetni izolaciji. Celična populacija vsebuje 0,6% $CD45^-$ celic pozitivnih za CD34 (Slika 12, spodnji levi diagram), kar je 10-krat več v primerjavi z rezultatom, ki so ga dobili Zuba-Surma in sod. V njihovem primeru $CD45^-/CD34^+$ celice predstavljajo le okoli 0,062% celotne celične populacije. Poleg deleža podtipov VSEL celic so preučevali tudi njihove morfološke značilnosti, kot npr. velikost, ki je variirala med 5 in 7 μm . Vsi celični podtipi VSEL celic so manjši od človeških eritrocitov, od teh pa so $CD45^-/CD34^+$ celice najmanjše velikosti.

Če primerjamo našo imunomagnetno izolacijo s tisto od Zuba-Surme in sod., smo v našem primeru preučevali vse podtipe, ki so značilni za VSEL celice, medtem pa so se oni osredotočili predvsem na celice, ki izražajo CD133 antigen. S pomočjo pretočne citometrije smo izmerili 0,4% CD45⁻/CD133⁺ celic (Slika 12, spodnji srednji diagram), po njihovih podatkih pa naj bi 1 ml enote PK vseboval v povprečju $166,2 \pm 41,6$ Lin⁻/CD45⁻/CD133⁺/SSEA-4⁺ celic, kar predstavlja 0,016% vseh izoliranih levkocitov. Omenjene celice so najmanjše med vsemi subpopulacijami, imajo največje razmerje med površino jedra in površino citoplazme ter najbolj izražajo pluripotentne označevalce (Zuba-Surma in sod., 2010).

V vzorcih smo izmerili 3,4% CD45⁻/CXCR4⁺ podtipa VSEL celic (Slika 12, spodnji desni diagram), dočim raziskava Zuba-Surme in sod. ni natančno definirala deleža CD45⁻ celic pozitivnih za CXCR4, kar jim Danova-Alt in sod. tudi očitajo. Rezultate lahko primerjamo kvečjemu na podlagi njihovih reprezentativnih grafov, iz katerih je razvidno, da subpopulacija Lin⁻/CD45⁻/CXCR4⁺ obsega delež manjši od 0,1% celotne levkocitne populacije in veljajo za največje glede na premer celice.

Isto zajeto celično populacijo, dobljeno po imunomagnetni izolaciji, smo nato na pretočnem citometru analizirali še po posameznih regijah. Regije predstavljajo različne velikosti subpopulacij in nam služijo za natančnejši vpogled dejanskih deležev celičnih podtipov CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/CD133⁺ in CD45⁻/CXCR4⁺.

Regija 1 tako predstavlja najmanjšo velikost zajete subpopulacije (Slika 13) in nam prikazuje 0,5% CD45⁻/CD34⁺, 0,1% CD45⁻/CD133⁺ in 3,3% CD45⁻/CXCR4⁺ celic. Sledi regija 2 (Slika 14), ki zajema malo večjo subpopulacijo celic in vsebuje 0,3% CD45⁻/CD34⁺, 0,1% CD45⁻/CD133⁺ in 3,8% CD45⁻/CXCR4⁺ celic. Regija 3 (Slika 15) vključuje celice, ki so druge največje po velikosti. Delež CD45⁻/CD34⁺ celic je 1,8%, CD45⁻/CD133⁺ celice zajemajo 0,6% celične populacije, CD45⁻/CXCR4⁺ celice pa 10,6%. Največjo subpopulacijo predstavlja regija 4 (Slika 16) in vsebuje 19,9% CD45⁻/CD34⁺, 8,0% CD45⁻/CD133⁺ in 24,8% CD45⁻/CXCR4⁺ celic. V Tabeli 6 lahko vidimo, da so deleži celičnih podtipov subpopulacije v regiji 4 v primerjavi s prejšnjimi regijami večji.

Na koncu smo želeli preveriti, koliko VSEL celic, ki so CD34⁺ CD133⁺ CXCR4⁺ in hkrati CD45⁻ celice, vsebujejo frakcije popkovnične krvi pridobljene z različnima izolacijskima metodama. Celoten pregled rezultatov dobljenih po obeh metodah izolacije je predstavljen v Tabeli 6.

Ko preučujemo deleže določenih markerjev, ki jih izražajo celične populacije, lahko iz preglednice vidimo, da so deleži posameznih označevalcev merjenih po magnetni izolaciji manjši od tistih merjenih po izolaciji s fokolom. Razlog temu je neustreznost izolacijskih pristopov, saj celice pozitivne za antigen SSEA-4 niso nujno obogatene v podtipih CD45⁻ CD34⁺, CD45⁻ CD133⁺ in CD45⁻ CXCR4⁺, ki so značilni za celice VSEL.

Dobljeni rezultati niso v skladu z našimi pričakovanji, saj deleži CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/CD133⁺ in CD45⁻/CXCR4⁺ celic niso podobni odstotkom navedenim v literaturi (Zuba-

Surma in sod., 2010). Na podlagi tega sta bili naši drugi dve hipotezi ovrženi, kar pomeni, da uporaba imunomagnetne selekcije usmerjene proti antigenu SSEA-4 kot druge stopnje pri izolaciji celic s karakteristikami VSEL ni primerna. Ravno tako izbrana imunomagnetna selekcija ni primerna za pridobitev celične frakcije, iz katere lahko nadaljnje izoliramo VSEL celice visoke čistosti.

V primeru prvega izolacijskega postopka, ki jo predstavlja izolacija s ficolom, navajamo, da le-ta ni primerna kot vmesni korak ali predkorak za izolacijo želenih matičnih celic. Glede na ugotovitve ne moremo z gotovostjo trditi, da se v izoliranem vzorcu po fikolu dejansko nahajajo matične celice z embrionalnimi lastnostmi, zato je še vedno treba upoštevati naravo celic in premisliti o možni uporabi lizirnih reagentov.

Ali je celična populacija iz vzorca popkovnične krvi obogatena v podtipih $CD45^+CD34^+$, $CD45^+CD133^+$ in $CD45^+CD184^+$, bi lahko preverili še z alternativnimi (FACS tehnika) ali izboljšanimi pristopi (MACS s specifičnimi MicroBeads). Pri slednji bi lahko uporabili specifične MicroBeads, s pomočjo katerih bi še natančneje določili velikosti celic, tudi med 2 in 15 μm . Tako bi lažje izolirali izredno majhne VSEL celice (Zuba-Surma in sod., 2010). Kljub temu bi vseeno bilo potrebno potrditi prisotnost VSEL celic še z drugimi molekularnimi metodami, kar pa terja še dodaten čas in denar.

Na splošno bi lahko izolacijske strategije izboljšali že z začetnim korakom shranjevanja popkovnične krvi. Raziskave kažejo, da se pred postopkom shranjevanja enot PK izgubi določena količina začetnega volumna. Ta korak predstavlja široko odprto okno za izboljšave. V prihodnosti bi lahko tudi uvedli elutracijo, ki bi nam služila za deplecijo eritrocitov in obogatitev majhnih celic (Zuba-Surma in sod., 2010). Elutracija je postopek ločevanja delcev na osnovi velikosti, oblike in gostote z uporabo plina ali tekočine, ki teče običajno v nasprotni smeri sedimentacije. Tudi v razvoju specifičnih protiteles za VSEL celice ostaja veliko možnosti za vzpostavitev kvalitetnejših izolacijskih postopkov. Protitelesa specifična za VSEL celice bi lahko omogočila direktno izolacijo le-teh iz populacije MNC iz popkovnične krvi. Ta protitelesa bi po vsej verjetnosti ciljala na antigene embrionalnih matičnih celic in tako bi lahko ustvarili nove klone za SSEA epitope (Zuba-Surma in sod., 2010).

5.2 SKLEPI

- V človeški popkovnični krvi smo identificirali celično populacijo, ki je pozitivna za antigen SSEA-4. Na podlagi tega smo lahko nadaljevali s postopkom pozitivne imunomagnetne selekcije usmerjene proti antigenu SSEA-4.
- Pozitivna imunomagnetna selekcija usmerjena proti antigenu SSEA-4 ni primerna za pridobitev celične populacije, ki je po fenotipski karakterizaciji obogatena v podtipih $CD45^+CD34^+$, $CD45^+CD133^+$ in $CD45^+CD184^+$, ki so značilni za celice VSEL ter posledično izbrane izolacijske metode ne moremo uporabiti za nadaljnjo izolacijo VSEL celic visoke čistosti.

6 POVZETEK

Večina celic v tkivih in organih odraslega človeka ni sposobnih podvajanja, da bi lahko nadomestile mrtve ali poškodovane celice. V preteklih letih pa so v različnih tkivih odraslega odkrili in dokazali matične celice s sposobnostjo diferenciacije v različne specifične tipe celic, ki bi omogočile regeneracijo poškodovanih tkiv in njihovo nadaljnjo funkcionalnost. Ta diferenciacijski potencial je podoben tistemu, ki ga imajo embrionalne matične celice, zato obstaja teoretska podlaga, ki predpostavlja možnost pridobitve pluripotentnih matičnih celic iz zrelega osebk (Ratajczak in sod., 2008; Bongso, 2013).

Poskusi izolacije se soočajo z izjemno nizko prisotnostjo pluripotentnih matičnih celic v bioloških vzorcih, zato je uspeh pridobitve obogatene celične populacije v veliki meri odvisen od izolacijskih pristopov. Med te najpogostejše spada imunomagnetna selekcija, kjer izoliramo celice, ki izražajo pluripotentne označevalce. V našem primeru smo označili in pozitivno izolirali celice, ki izražajo antigen SSEA-4. Omenjen antigen je značilno izražen na mnogih matičnih celicah, kakor tudi na celicah VSEL (Miltenyi Biotec, 2012).

Celice VSEL so bile odkrite nedavno nazaj in kažejo lastnosti podobne embrionalnim matičnim celicam, zato se opravičeno domneva, da bi jih lahko uporabljali v terapevtske namene. So zelo majhne (cca 3,5 μm v premeru), imajo veliko jedro obdano z ozkim robom citoplazme ter vsebujejo neorganiziran evkromatin. Kljub temu, da so majhne, vsebujejo diploidno DNA ter številne mitohondrije (Kucia in sod., 2006). So visoko obogatene v populaciji celic s fenotipom $\text{CD34}^+ \text{CD133}^+ \text{CXCR4}^+ \text{lin}^- \text{CD45}^-$ ter poleg antigena SSEA-4 izražajo še pluripotentna transkripcijska faktorja Oct-4 in Nanog (Kucia in sod., 2007).

Pomemben vir za izolacijo VSEL celic je popkovnična kri, ki predstavlja enega najbolj dosegljivih virov matičnih celic pri človeku. Način odvzema krvi je popolnoma neinvaziven, vzorec je na voljo v razmeroma velikih količinah in je iz etičnega vidika nesporna metoda (Leeb in sod., 2010; Rožman in sod., 2007).

Nobenega dvoma ni, da je trenutno medicinska znanost usmerjena v matične celice, ki bi nam omogočile kakovostnejše življenje (Ratajczak in sod., 2008). Posledično si mnogo znanstvenikov prizadeva odkriti t.i. "zlati standard" med obstoječimi izolacijskimi pristopi za pridobitev teh pomembnih celic.

Poglavitni namen naše študije je bila preučitev imunomagnetne selekcije usmerjene proti antigenu SSEA-4 kot ustrezne izolacijske metode za pridobitev obogatene celične populacije, s karakteristikami VSEL celic, iz vzorca popkovnične krvi. Želeli smo pridobiti celično populacijo, ki bi bila po fenotipski karakterizaciji obogatena v podtipih $\text{CD45}^- / \text{CD34}^+$, $\text{CD45}^- / \text{CD133}^+$ in $\text{CD45}^- / \text{CXCR4}^+$. Ravno tako smo želeli preveriti ali je izbrana izolacijska metoda primerna za pridobitev celične frakcije, iz katere lahko nadaljnje izoliramo VSEL celice visoke čistosti.

Najprej smo z uporabo pretočne citometrije izmerili delež SSEA-4⁺ celic v vzorcih popkovnične krvi po izolaciji s fikolom. Tako smo potrdili prvo hipotezo, da se v človeški popkovnični krvi nahaja celična populacija, ki je pozitivna za antigen SSEA-4. Na podlagi te ugotovitve smo lahko nadaljevali s postopkom pozitivne imunomagnetne selekcije usmerjene proti antigenu SSEA-4.

Rezultati dobljeni po MACS niso v skladu z našimi pričakovanji, saj deleži CD45⁺/CD34⁺, CD45⁺/CD133⁺ in CD45⁺/CXCR4⁺ celic niso podobni odstotkom navedenim v literaturi (Zuba-Surma in sod., 2010). Zaradi tega je predpostavljena hipoteza o uporabi imunomagnetne selekcije usmerjene proti antigenu SSEA-4 za pridobitev celic s karakteristikami VSEL ovržena. Ravno tako izbrana imunomagnetna selekcija ni primerna za pridobitev celične frakcije, iz katere lahko nadaljnje izoliramo VSEL celice visoke čistosti. Kljub temu bi vseeno bilo potrebno potrditi prisotnost VSEL celic še z drugimi molekularnimi metodami, kar pa terja še dodaten čas in denar.

V primeru prvega dela izolacijskega postopka, ki ga predstavlja izolacija s fikolom, navajamo, da le-ta ni primeren kot predkorak za izolacijo želenih matičnih celic. Glede na ugotovitve ne moremo z gotovostjo trditi, da se v izoliranem vzorcu po fikolu dejansko nahajajo matične celice z embrionalnimi lastnostmi, zato je še vedno treba upoštevati naravo celic in premisliti o možni uporabi lizirnih reagentov.

Na splošno bi lahko izolacijske strategije izboljšali že z začetnim korakom shranjevanja popkovnične krvi, saj raziskave kažejo, da se pred postopkom shranjevanja enot PK izgubi določena količina začetnega volumna. Ta korak predstavlja široko odprto okno za izboljšave. Tudi v razvoju specifičnih protiteles za VSEL celice ostaja veliko možnosti za vzpostavitev kvalitetnejših izolacijskih postopkov (Zuba-Surma in sod., 2010).

7 VIRI

- Amit M., Carpenter M.K., Inokuma M.S., Chiu C.P., Harris C.P., Waknitz M.A., Itskovitz-Eldor J., Thomson J.A. 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental Biology*, 227, 2: 271-278
- Andrews P.W., Banting G., Damjanov I., Arnaud D., Avner P. 1984. Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Hybridoma*, 3, 4: 347-361
- Andrews P.W., Goodfellow P.N., Shevinsky L.H., Bronson D.L., Knowles B.B. 1982. Cell-surface antigens of a clonal human embryonal carcinoma cell line: Morphological and antigenic differentiation in culture. *International Journal of Cancer*, 29, 5: 523-531
- Atkin N.B., Baker M.C., Robinson R., Gaze S.E. 1974. Chromosome studies on 14 near-diploid carcinomas of the ovary. *European Journal of Cancer*, 10, 3: 143-146
- Bang A.G., Carpenter M.K. 2009. Characteristics and Characterization of Human Pluripotent Stem Cells. V: *Essentials of Stem Cell Biology*. 2. izdaja. Lanza R., Gearhart J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomas E.D., Thomson J., Wilmot S.I. (ur.). San Diego, Academic Press: 339-343
- Battula V.L., Bareiss P.M., Treml S., Conrad S., Albert I., Hojak S., Abele H., Schewe B., Just L., Skutella T., Bühring H.J. 2007. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation*, 75, 4: 279-291
- Beltrami A.P., Cesselli D., Bergamin N., Marcon P., Rigo S., Puppato E., D'Aurizio F., Verardo R., Piazza S., Pignatelli A., Poz A., Baccarani U., Damiani D., Fanin R., Mariuzzi L., Finato N., Masolini P., Burelli S., Belluzzi O., Schneider C., Beltrami C.A. 2007. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver and bone marrow). *Blood*, 110, 9: 3438-3446
- Bongso A., Fong C.Y. 2013. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9, 2: 226-240
- Bossuyt X., Marti G.E., Fleisher T.A. 1997. Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*, 30: 124-133
- Bradley A., Evans M., Kaufman M.H., Robertson E. 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309: 255-256

- Brons I.G., Smithers L.E., Trotter M.W., Rugg-Gunn P., Sun B., Chuva de Sousa Lopes S.M., Howlett S.K., Clarkson A., Ahrlund-Richter L. 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, 448: 191-195
- Byrne J.A., Pedersen D.A., Clepper L.L., Nelson M., Sanger W.G., Gokhale S., Wolf D.P., Mitalipov S.M. 2007. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 450: 497-502
- Cedarlane Laboratories Ltd. Lympholyte®-H. 2013. Cedarlane Laboratories Ltd.: 4 str. (Navodilo za uporabo)
- Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A., Eggan K. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 309, 5739: 1369-1373
- D'Ippolito G., Diabira S., Howard G.A., Menei P., Roos B.A., Schiller P.C. 2004. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *Journal of Cell Science*, 117: 2971-2981
- D'Ippolito G., Howard G.A., Roos B.A., Schiller P.C. 2006. Isolation and characterization of marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells. *Experimental Hematology*, 34: 1608-1610
- Danova-Alt R., Heider A., Egger D., Cross M., Alt R. 2012. Very small embryonic-like stem cells purified from umbilical cord blood lack stem cell characteristics. *PLoS ONE*, 7, 4, e34899
- Darovanje popkovnične krvi. 2014. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. http://www.ztm.si/sl/register_darovalcev_kmc/darovanje_popkovnicne_krvi/ (7. jan. 2014)
- Evans M.J., Kaufman M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156
- Factor D.C., Najm F.J., Tesar P.J. 2013. Generation and characterization of epiblast stem cells from blastocyst-stage mouse embryos. *Epiblast Stem Cells Methods in Molecular Biology*, 1074: 1-13
- Freshney R.I., Glyn N.S., Auerbach J.M. 2007. *Culture of Human Stem Cells*. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.: 360 str.
- Friedenstein A.J., Piatetzky-Shapiro I.I., Petrakova K.V. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 16, 3: 381-390

- Gachelin G., Kemler R., Kelly F., Jacob F. 1977. PCC4, a new cell surface antigen common to multipotential embryonal carcinoma cells, spermatozoa, and mouse early embryos. *Developmental Biology*, 57, 1: 199-209
- Gardner R.L., Rossant J. 1979. Investigation of the fate of 4–5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 52: 141-152
- Gilbert S.F. 2000. *Developmental Biology*. 6. izdaja, Sunderland, Sinauer Associates, Inc.: 749 str.
- Guan K., Nayernia K., Maier L.S., Wagner S., Dressel R., Lee J.H., Nolte J., Wolf F., Li M., Engel W., Hasenfuss G. 2006. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 440: 1199-1203
- Halasa M., Baskiewicz-Masiuk M., Dabkowska E., Machalinski B. 2008. An efficient two-step method to purify very small embryonic-like (VSEL) stem cells from umbilical cord blood (UCB). *Folia histochemica et cytobiologica*, 46, 2: 239-243
- Hogan B., Fellous M., Avner P., Jacob F. 1977. Isolation of a human teratoma cell line which expresses F9 antigen. *Nature*, 270: 515-518
- Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Deans R.J., Krause D.S., Keating A. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*; 7, 5: 393-395
- Ingram D.A., Caplice N.M., Yoder M.C. 2005. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*, 106, 5: 1525-1531
- Jaenisch R., Young R. 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 132, 4: 567-582
- Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49
- Johnson J., Bagley J., Skaznik-Wikiel M., Lee H.J., Adams G.B., Niikura Y., Tschudy K.S., Canning Tilly J., Cortes M.L., Forkert R., Spitzer T., Iacomini J., Scadden D.T., Tilly J.L. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, 122, 2: 303-315
- Kahan B.W., Ephrussi B. 1970. Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 44, 5: 1015-1036

- Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J., Yoshimoto M., Ogonuki N., Miki H., Baba S., Kato T., Kazuki Y., Toyokuni S., Toyoshima M., Niwa O., Oshimura M., Heike T., Nakahata T., Ishino F., Ogura A., Shinohara T. 2004. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*, 119, 7: 1001-1012
- Kannagi R., Cochran N.A., Ishigami F., Hakomori S., Andrews P.W., Knowles B.B., Solter D. 1983. Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *The EMBO Journal*, 2, 12: 2355-2361
- Kemp K.C., Hows J., Donaldson C. 2005. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leukemia & Lymphoma*, 46, 11: 1531-1544
- Kleinsmith L.J., Pierce Jr. G.B. 1964. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Research*, 24: 1544-1551
- Kucia M., Halasa M., Wysoczynski M., Baskiewicz-Masiuk M., Moldenhawer S., Zuba-Surma E., Czajka R., Wojakowski W., Machalinski B., Ratajczak M.Z. 2007. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4⁺ SSEA-4⁺ Oct-4⁺ very small embryonic-like cells purified from human cord blood - preliminary report. *Leukemia*, 21: 297-303
- Kucia M., Reza R., Campbell F.R., Zuba-Surma E., Majka M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2006. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+) SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, 20: 857-869
- Kucia M., Reza R., Jala V.R., Dawn B., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2005. Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia*, 19: 1118-1127
- Labosky P.A., Barlow D.P., Hogan B.L. 1994. Mouse embryonic germ (EG) cell lines: Transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development*, 120: 3197-3204
- Lah Turnšek T., Obrez M., Motaln H., Tajnšek U. 2013. Vloga matičnih celic pri napredovanju in zdravljenju glioma. *Zdravniški Vestnik*, 82: 113-22
- Lanza R., Gearhart J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Donnell Thomas E., Thomson J., Wilmut I. 2009. *Essentials of Stem Cell Biology*. 2. izdaja, San Diego, Academic Press & Elsevier, Inc.: 680 str.
- Laurent L. C., Ulitsky I., Slavin I., Tran H., Schork A., Morey A., Lynch C., Harness J.V., Lee S., Barrero M.J., Ku S., Martynova M., Semechkin R., Galat V., Gottesfeld J., Belmonte J.C.I., Murry C., Keirstead H.S., Park H.S., Schmidt U., Laslett A.L., Muller F.J. Nievergelt C.M., Shamir R., Loring J.F. 2011. Dynamic changes in the copy

- number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*, 8, 1: 106-118
- Leeb C., Jurga M., McGuckin C., Moriggl R., Kenner L. 2010. Promising new sources for pluripotent stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 6, 1: 15-26
- Mahantappa A., Banik A., Shivshankar J., Rao S.G.A. 2008. The stem cell in the umbilical cord blood is not related to volume and nucleated cell count. *Indian Journal of Biotechnology*, 7, 4: 547-549
- Martin G.R. 1980. Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science*, 209, 4458: 768-776
- Martin G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 12: 7634-7638
- Matsui Y., Zsebo K., Hogan B.L. 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 70, 5: 841-847
- McGuckin C.P., Basford C., Hanger K., Habibollah S., Forraz N. 2007. Cord blood revelations: the importance of being a first born girl, big, on time and to a young mother! *Early Human Development*, 83, 12: 733-741
- Melton D.A., Cowan C. 2009. "Stemness": Definitions, Criteria and Standards. V: *Essentials of Stem Cell Biology*. Lanza R., Gearhart J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomas E.D., Thompson J., Wilmut S.I. (ur.). San Diego, Academic Press: XXIII-XXIX
- Miltenyi Biotec. MACS Separation Protocol with human Anti-SSEA-4 MicroBeads. 2012. Miltenyi Biotec: 4 str. (Navodilo za uporabo)
- Mimeault M., Batra S.K. 2006. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells*, 24, 11: 2319-45
- Murry C.E., Keller G. 2008. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*, 132, 4: 661-680
- Pelosi E., Valtieri M., Coppola S., Botta R., Gabbianelli M., Lulli V., Marziali G., Masella B., Müller R., Sgadari C., Testa U., Bonanno G., Peschle C. 2002. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood*, 100, 9: 3203-3208
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 5411: 143-147

- Popkovnična kri v javni banki. 2015. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino.
<http://www.ztm.si/register-darovalcev/javna-banka-popkovnicne-krvi/popkovnicna-kri-v-javni-banki/> (28. apr. 2015)
- Presajanje tkiv živih darovalcev. 2014. Zavod Republike Slovenije za presaditve organov in tkiv.
<http://www.slovenija-transplant.si/index.php?id=zivih-darovalcev> (7. jun. 2014)
- Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E., Machalinski B., Kucia M. 2007. Bone-marrow-derived stem cells-our key to longevity? *Journal of Applied Genetics*, 48, 4: 307-19
- Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E., Wojakowski W., Ratajczak J., Kucia M. 2008. Bone marrow - home of versatile stem cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 35, 3: 248-259
- Resnick J.L., Bixler L.S., Cheng L., Donovan P.J. 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 359: 550-551
- Rossant J. 2008. Stem cells and early lineage development. *Cell*, 132, 4: 527-531
- Rožman P., Domanović D., Knežević M. 2012. Shranjevanje matičnih celic iz popkovnične krvi – danes in jutri. *Zdravniški Vestnik*, 81: 44-53
- Rožman P., Strbad M., Knežević M. 2007. Uporaba matičnih celic v medicini. V: Genialna prihodnost - genetika, determinizem in svoboda. Mednarodni posvet Biološka znanost in družba, Ljubljana, 4-5 okt. 2007. Strgulc-Krajšek S., Popit T., Vičar M., Scrader Š. (ur.). Ljubljana, Zavod RS za šolstvo: 202-212
- Saitou M., Barton S.C., Surani M.A. 2002. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature*, 418: 293-300
- Shah K. 2012. Mesenchymal stem cells engineered for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 8: 739-748
- Shamblott M.J., Axelman J., Wang S., Bugg E.M., Littlefield J.W., Donovan P.J., Blumenthal P.D., Huggins G.R., Gearhart J.D. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 23: 13726-13731
- Smith A.G. 2001. Embryo-derived stem cells: Of mice and men. *Annual Reviews Cell and Developmental Biology*, 17: 435-62
- Smith K.P., Luong M.X., Stein G.S. 2009. Pluripotency: toward a gold standard for human ES and iPS cells. *Journal of Cell Physiology*, 220, 1: 21-29

- Šimc M., Strbad M., Jež M., Rožman P. 2012. Zdravljenje z matičnimi celicami. Zdravniški Vestnik, 81: 634-44
- Tada, M., Tada T., Lefebvre L., Barton S.C., Surani M.A. 1997. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. The EMBO Journal, 16, 21: 6510-6520
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 126, 4: 663-676
- Tam P.L., Behringer R.R. 1997. Mouse gastrulation: the formation of mammalian body plan. Mechanisms of Development, 68, 1-2: 3-25
- Tarkowski A.K. 1959: Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. Nature, 184, 4695: 1286-1287
- Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A., Davies T.J., Evans E.P., Mack D.L., Gardner R.L., McKay R.D. 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. Nature, 448: 196-199
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 282, 5391: 1145-1147
- Turnpenny L., Brickwood S., Spalluto C.M., Piper K., Cameron I.T., Wilson D.I., Hanley N.A. 2003. Derivation of human embryonic germ cells: an alternative source of pluripotent stem cells. Stem Cells, 21, 5: 598-609
- Van der Kooy D., Weiss S. 2000. Why stem cells? Science, 287, 5457: 1439-41
- Waller E.K., Olweus J., Lund-Johansen F., Huang S., Nguyen M., Guo G.R., Terstappen L. 1995. The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. Blood, 85, 9: 2422-2435
- Weissman I.L. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell, 100, 1: 157-168
- Weissman I.L., Anderson D.J., Gage F. 2001. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments and transdifferentiations. Annual Reviews Cell and Developmental Biology, 17: 387-403
- Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., Jaenisch R. 2007. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. Nature, 448: 318-324

- Yu J., Thomson J.A. 2008. Pluripotent stem cell lines. *Genes & Development*, 22: 1987-1997
- Yu J., Vodyanik M.A., He P., Slukvin I.I., Thomson J.A. 2006. Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell–cell fusion. *Stem Cells*, 24, 1: 168-176
- Zhao Y., Wang H., Mazzone T. 2006. Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics. *Elsevier*, 312, 13:2454-2464
- Zuba-Surma E., Klich I., Greco N., Laughlin M.J., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2010. Optimization of isolation and further characterization of umbilical cord blood-derived very small embryonic/ epiblast-like stem cells (VSELs). *European Journal of Haematology*, 84, 1: 34-46

ZAHVALA

Najprej se iskreno zahvaljujem somentorju doc. dr. Urbanu Švajgerju, da me je kljub njegovi zasedenosti vzel pod svoje okrilje, mi nudil pomoč ter koristne nasvete. Moram omeniti, da je strokovnost doc. dr. Urbana Švajgerja impresivna in vredna spoštovanja s strani mladih raziskovalcev kot njegovih akademskih kolegov.

Posebej se zahvaljujem mentorju doc. dr. Miomirju Kneževiću, ker me je tekom študija še posebej navdušil nad področjem regenerativne medicine in dela z matičnimi celicami. Mislim, da mladi potrebujemo več takšnih mentorjev kot je doc. dr. Knežević, saj poleg akademske strokovnosti nudi zgled dejanske uporabnosti le-te za dobrobit družbe.

Zahvala gre tudi recenzentki prof. dr. Tanji Kunej, ki je kljub njeni časovni stiski privolila za pregled diplomskega dela in le-tega popravila z izredno natančnostjo in korektnostjo.

Zahvaljujem se gospe Nevenki Valič, saj je z njeno pomočjo oddaja diplomskega dela potekala brez dodatnih zapletov.

Hvala vsem zaposlenim na Enoti za shranjevanje popkovnične krvi na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, ki so mi omogočili dostop do vzorcev popkovnične krvi in nemoteno delo med samim eksperimentalnim delom.

Na koncu se zahvaljujem moji družini, prijateljem in fantu, ki so mi od samega začetka diplomskega dela stali ob strani.