

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Lucija KADUNC

**IZRAŽANJE PARAKRINIH DEJAVNIKOV
MATIČNIH CELIC ZA IZBOLJŠANJE CELJENJA
RAN V *IN VITRO* CELIČNEM MODELU**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Lucija KADUNC

**IZRAŽANJE PARAKRINIH DEJAVNIKOV MATIČNIH CELIC ZA
IZBOLJŠANJE CELJENJA RAN V *IN VITRO* CELIČNEM MODELU**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

**EXPRESSION OF STEM CELLS PARACRINE FACTORS FOR
IMPROVEMENT OF WOUND HEALING IN *IN VITRO* CELL MODEL**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes – Biotechnology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje – Biotehnologija. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Po sklepu Komisije za študij 1. in 2. stopnje je bil za mentorja imenovan prof. dr. Simon Horvat, za somentorja dr. Iva Hafner Bratkovič in za recenzenta prof. dr. Gregor Anderluh.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: prof. dr. Simon HORVAT
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Iva HAFNER BRATKOVIČ
 Kemijski inštitut, Laboratorij za biotehnologijo

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

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

Lucija Kadunc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 606:61(043.2)
KG celjenje ran/rastni dejavniki/matične celice/*in vitro* model za celjenje ran
AV KADUNC, Lucija, dipl. bioteh. (UN)
SA HORVAT, Simon (mentor)/HAFNER BRATKOVIČ, Iva (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2014
IN IZRAŽANJE PARAKRINIH DEJAVNIKOV MATIČNIH CELIC ZA IZBOLJŠANJE CELJENJA RAN V *IN VITRO* CELIČNEM MODELU
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. Stopnja Biotehnologija)
OP XV, 78 str., 30 pregl., 23 sl., 53 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Celjenje ran je kompleksen in dobro reguliran proces, ki se začne takoj po poškodbi in je sestavljen iz hemostaze, faze vnetja, faze proliferacije in faze preoblikovanja tkiva. Motnje v celjenju vodijo v nastanek kroničnih ran, ki so velik problem v zdravstvu. Nastanku kroničnih ran so bolj izpostavljeni starejši, diabetiki, žilni bolniki in ljudje z inficiranimi ranami. Za zdravljenje kroničnih ran se uporabljajo različne terapije, vendar je zdravljenje kljub temu še vedno dolgotrajno. Kot obetavna terapija za celjenje ran se ponuja uporaba matičnih celic ali medija, v katerem so rasle matične celice. Znano je, da matične celice izločajo veliko število različnih topnih molekul, ki pozitivno vplivajo na celjenje. V okviru magistrske naloge smo žeeli ovrednotiti vpliv posameznih rastnih dejavnikov na celjenje ran. Z uporabo trenutno dostopne literature smo identificirali rastne dejavnike, ki jih izločajo matične celice in pozitivno vplivajo na celjenje. Izbrane rastne dejavnike smo izrazili v sesalskih celičnih linijah HEK293T in NIH3T3 in potrdili njihovo izražanje z uporabo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo, western prenosom in z encimskoimunskimi testi. Vpliv posameznega rastnega dejavnika na celjenje smo ocenili s testom zapiranja raze v pogojih *in vitro*. Pokazali smo, da rastni dejavniki EGFL-7, FGF-2, IGF-I, PDGF-B, TGF- β 1 in VEGF-A pozitivno vplivajo na celjenje v *in vitro* modelu celjenja ran. Ti rezultati potrjujejo možnost terapevtske uporabe celične terapije, s katero se lahko izognemo neželenemu učinku uporabe matičnih celic.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 606:61(043.2)
CX wound healing/growth factors/stem cells/*in vitro* wound healing model
AU KADUNC, Lucija
AA HORVAT, Simon (supervisor)/HAFNER BRATKOVIČ, Iva (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study in Biotechnology
PY 2014
TI Expression of stem cells paracrine factors for improvement of wound healing in *in vitro* cell model
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes - Biotechnology)
NO XV, 78 p., 30 tab., 23 fig., 53 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Wound healing is a complex and well-regulated process that begins immediately after the injury of the skin and is composed of hemostasis, inflammation phase, proliferation phase and remodeling of tissue. Disturbances in the wound healing process lead to the formation of chronic wounds, which represents a major problem in health care. Elderly, diabetics, vascular and infected wounds patients are more vulnerable for the formation of chronic wounds. There are various strategies for healing chronic wounds, but treatments are still not optimal. Use of stem cells or the medium in which the stem cells are grown, is a promising therapy for chronic wounds. It is known that stem cells secrete a large number of different soluble molecules, with a positive effect on healing. In the context of this master's thesis, we wanted to evaluate the impact of individual growth factors on wound healing. Using literature we identified growth factors secreted by stem cells and reported to have a positive impact on healing. Selected growth factors were expressed in mammalian cells HEK293T and NIH3T3. Production of growth factors was confirmed using a quantitative polymerase chain reaction, the Western blot and enzyme immunoassay. The effect of each growth factor on the healing was evaluated with a scratch test *in vitro*. We have demonstrated that growth factors EGFL-7, FGF-2, IGF-I, PDGF-B, TGF- β 1 and VEGF-A have a positive effect on the healing process in the wound healing *in vitro* model. These results confirm possible use of cell therapy that could be used instead of stem cell therapy.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	X
SEZNAM GESEL	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
SLOVARČEK	XV
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 CILJI NALOGE.....	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 KOŽA	3
2.1.1 Funkcija kože	3
2.1.2 Epidermis	4
2.1.3 Dermis.....	5
2.1.4 Hipodermis	5
2.2 CELJENJE RAN.....	6
2.2.1 Hemostaza	7
2.2.2 Vnetje.....	7
2.2.3 Proliferacija.....	8
2.2.4 Preoblikovanje tkiva	10
2.3 RASTNI DEJAVNIKI	11
2.3.1 Družina epidermalnih rastnih dejavnikov	12
2.3.2 Družina fibroblastnih rastnih dejavnikov.....	13

2.3.3	Družina transformirajočih rastnih dejavnikov	13
2.3.4	Družina rastnih dejavnikov iz trombocitov	14
2.3.5	Vaskularno endotelijski rastni dejavniki	14
2.3.6	Inzulinu podobni rastni dejavnik.....	15
2.3.7	Ostali dejavniki.....	15
2.3.8	Vnetni citokini.....	16
2.4	MOTNJE V CELJENJU RAN	17
2.4.1	Kronične rane	17
2.4.2	Sodobne strategije terapije celjenja ran	18
2.5	MATIČNE CELICE	20
2.5.1	Terapije z uporabo matičnih celic.....	20
2.5.2	Izločeni dejavniki matičnih celic	21
2.5.3	Omejitve uporabe matičnih celic.....	22
3	MATERIALI IN METODE	24
3.1	MATERIALI	24
3.1.1	Laboratorijska oprema	24
3.1.2	Kemikalije	25
3.1.3	Raztopine in pufri.....	26
3.1.4	Plazmidi	27
3.1.5	Geni	27
3.1.6	Restriktijski encimi	28
3.1.7	Začetni oligonukleotidi.....	28
3.1.8	Protitelesa	30
3.1.9	Gojišča	30
3.1.10	Organizmi.....	30
3.2	METODE	32
3.2.1	Sterilizacija gojišč in materialov	32
3.2.2	Priprava gojišč	32
3.2.3	Molekularne metode.....	32

3.2.4	Gojenje celičnih kultur.....	36
3.2.5	Transfekcija celičnih kultur	37
3.2.6	Pridobivanje rastnih dejavnikov.....	38
3.2.7	Vrednotenje transkripcije rastnih dejavnikov v transficiranih celicah	38
3.2.8	Proteini	41
3.2.9	Model za celjenje rane.....	42
3.2.10	Mikroskopija.....	43
3.2.11	Analiza slik	43
4	REZULTATI	45
4.1	IZBIRA RASTNIH DEJAVNIKOV	45
4.2	PRIPRAVA KONSTRUKTOV.....	45
4.3	IZRAŽANJE GENOV	47
4.3.1	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo	47
4.4	PRODUKCIJA PROTEINOV	50
4.4.1	Potrditev izražanja EGFL7	50
4.4.2	Potrditev izražanja FGF-2, IGF-I, PDGF-B, TGF-β1 in VEGF-A.....	51
4.5	TEST HITROSTI ZAPIRANJA RAZE	53
5	RAZPRAVA	65
5.1	IZRAŽANJE GENOV V TRANSFICIRANIH CELICAH	65
5.1.1	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo	65
5.2	PRODUKCIJA PROTEINOV V SESALSKIH CELICAH	66
5.2.1	Western prenos za določitev izražanja proteinov.....	66
5.2.2	Encimskoimunski testi za določitev izražanja proteinov	67
5.3	POVEČANJE HITROSTI ZAPIRANJA RAZ Z DODATKOM MEDIJA Z RASTNIMI DEJAVNIKI	68
6	SKLEPI	71
7	POVZETEK.....	72
8	VIRI.....	74

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Citokini, ki vplivajo na celjenje ran (Barrientos in sod., 2008; Singer in Clark, 1999).....	11
Preglednica 2: Laboratorijska oprema.....	24
Preglednica 3: Uporabljene kemikalije.....	25
Preglednica 4: Pufri in raztopine za delo z DNA	26
Preglednica 5: Pufri in raztopine uporabljeni za delo s celičnimi kulturami.....	26
Preglednica 6: Pufri in raztopine za delo s proteini.....	26
Preglednica 7: Uporabljeni geni	27
Preglednica 8: Uporabljeni restrikcijski encimi	28
Preglednica 9: Preglednica začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje rastnih dejavnikov z metodo verižne reakcije s polimerazo	28
Preglednica 10: Preglednica začetnih oligonukleotidov za kvantitativno metodo verižne reakcije s polimerazo	29
Preglednica 11: Uporabljeni protitelesa.....	30
Preglednica 12: Gojišča za gojenje bakterij	30
Preglednica 13: Bakterijske kulture.....	30
Preglednica 14: Celične kulture.....	31
Preglednica 15: Sestava reakcijske mešanice za PCR reakcijo	32
Preglednica 16: Temperaturni profil PCR reakcije	33
Preglednica 17: Sestava reakcijske mešanice za restrikcijo	34
Preglednica 18: Preglednica števila celic in volumna gojišča potrebnega za nasaditev celic ..	37
Preglednica 19: Preglednica reakcijskih volumnov in količine DNA za transfekcijo	37
Preglednica 20: Sestava reakcijske mešanice za razgradnjo DNA	38
Preglednica 21: Reakcijska mešanica za reverzno transkripcijo	39
Preglednica 22: Temperaturni profil reverzne transkripcije.....	39
Preglednica 23: Sestava reakcijske mešanice za kvantitativni PCR	39
Preglednica 24: Temperaturni profil reakcije PCR v realnem času	40
Preglednica 25: Sestava ločitvenega in vstopnega gela za poliakrilamidno gelsko elektroforezo	41
Preglednica 26: Pričakovane dolžine fragmentov po restrikcijski analizi.....	46
Preglednica 27: Izračunane vrednosti povečanja ekspresije genov v transficiranih celicah v primerjavi z netransficiranimi celicami	47
Preglednica 28: Pričakovane dolžine fragmentov po reakciji qPCR in uporabljeni začetni nukleotidi	48

Preglednica 29: Koncentracije rastnih dejavnikov v gojiščih, v katerih so rasle celice HEK293T	51
Preglednica 30: Koncentracije rastnih dejavnikov v gojiščih, v katerih so rasle stabilno transficirane celice NIH3T3	52

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Struktura kože in subkutanega tkiva (Saladin, 2009).....	3
Slika 2:Prikaz zgradbe epidermisa (Saladin, 2009).....	4
Slika 3: Prikaz celjenja preko regeneracije ali fibroze (Gurtner in sod., 2008)	6
Slika 4: Prikaz različnih faz celjenja rane (Saladin, 2009).....	7
Slika 5: Shematski prikaz dogajanja med vnetno fazo celjenja (Singer in Clark, 1999)	8
Slika 6: Prikaz rane v fazi proliferacije (Singer in Clark, 1999)	9
Slika 7: Prikaz rane v fazi preoblikovanja tkiva (Gurtner in sod., 2008)	10
Slika 8: Mehanizmi delovanja rastnih dejavnikov (Braun in sod., 2002)	12
Slika 9: Razlike v fiziologiji normalne in kronične rane (Clark in sod., 2007).....	18
Slika 10: Shematski prikaz terapij za izboljšanje celjenja ran (Jayaraman in sod., 2013)	19
Slika 11: Shematski prikaz plazmida pcDNA3 (Invitrogen).....	27
Slika 12: Analiza slike raze za kvantifikacijo.	43
Slika 13: Nastavitev programa ImageJ za analizo delcev na sliki.....	44
Slika 14: Rezultat analize raz s programom ImageJ.....	44
Slika 15: Kontrolne restrikcije plazmidov z zapisi za rastne dejavnike.	45
Slika 16: Produkti kvantitativne verižne reakcije s polimerazo.	48
Slika 17: Membrani z nanešenimi vzorci celic HEK293T in celic NIH3T3 po imunodetekciji	50
Slika 18: Graf odstotka zaprtja raze ob dodatku visokih koncentracij rastnih dejavnikov po 24 urah	53
Slika 19: Slika zapiranja raz ob dodatku medija z rastnimi dejavniki.....	56
Slika 20: Graf odstotka zaprtja raze ob dodatku enakih koncentracij rastnih dejavnikov po 24 urah	57
Slika 21: Slika zapiranja raz ob dodatku medija z rastnimi dejavniki v enakih koncentracijah (35ng/ml).	60
Slika 22: Graf odstotka zaprtja raz ob dodatku različnih koncentracij rastnega dejavnika FGF-2 po 24 urah.....	61
Slika 23: Slika zaprtja raz ob dodatku medija, z različnimi koncentracijami rastnega dejavnika FGF-2	63

SEZNAM GESEL

Matične celice	Nediferencirane celice večceličnih organizmov, ki so sposobne mnogih delitev in se lahko differencirajo v različne celične tipe.
Celjneje ran	Komplesken interaktivni proces tekom katrega pride do popravila poškodovane kože in obnovitve kožne bariere.
Rastni dejavnik	Molekula, ki preko vezave na specifične receptorje vpliva na rast določenega tkiva.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

% (m/v)	Utežni odstotek
% (v/v)	Volumski odstotek
% (w/v)	Masno-volumski odstotek
∞	Neskončno
ang.	Angleško
APS	Amonijev persulfat
ATA	Celotni zračni tlak okolja (vključno z zračnim pritiskom)
bp	Bazni par
Da	dalton (1 enota atomske mase)
DMEM	Gojišče za celične kulture (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMEM/F-12	Gojišče za celične kulture (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium /Ham's F-12 Nutrient Mixture)
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
dNTP	Deoksiribonukleotidi
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin tetraacetna kislina
EGF	Epidermalni rastni dejavnik
EGFL-7	Epidermalnemu rastnemu dejavniku podobni protein 7
ELISA	Encimskoimunski test (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
FBS	Fetalni goveji serum (ang. fetal bovine serum)
FGF	Fibroblastni rastni dejavnik
HBEGF	Heparin vezalni rastni dejavnik

HEK293T	Trajna celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic (ang. human embryonic kidney cell line) z vstavljenim SV40 T antigenom
HPRT	Hipoksantin fosforibozil transferaza 1
IGF-I	Inzulinu podobni rastni dejavnik 1
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
iPC	Inducirane pluripotentne matične celice
KGF	Keratinocitni rastni dejavnik
LB	Gojišče Luria-Bertani
MMP	Metaloproteinaze matriksa
MQ	Milli-Q voda (dodatno očiščena deionizirana voda)
mRNA	Informacijska ribonukleinska kislina
PBS	Fosfatni pufer s soljo (ang. phosphate buffer saline)
PCR	Verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PDGF	Rastni dejavnik iz trombocitov
PEI	Polietilenimin
qPCR	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (ang. quantitative polymerase chain reaction)
RD	Rastni dejavnik
SDS	Natrijev dodecilsulfat
SDS-PAGE	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS
TEMED	N, N, N, N-tetrametil-etilendiamin
TGF- α	Transformirajoči rastni dejavnik alfa

TGF- β	Transformirajoči rastni dejavnik beta
T_m	Temperatura tališča (ang. melting temperature)
TNF- α	Dejavnik tumorske nekroze alfa
Tris	Tris (hidroksimetil)-aminometan
VEGF	Vaskularno endoteljski rastni dejavnik
vrt./min	Vrtljaji na minuto
α	Alfa
β	Beta

SLOVARČEK

HEK293T	Trajna celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic z vstavljenim velikim T-antigenom virusa SV40.
NIH3T3	Trajna celična kultura pridobljena iz mišjih embrionalnih fibroblastov.
Rastni dejavnik	Rastni dejavniki v organizmu vplivajo na celično rast, proliferacijo, diferenciacijo celic ter na številne druge celične procese. Rastni dejavniki so signalne molekule, ki delujejo preko vezave na specifične receptorje.

1 UVOD

Celjenje ran je kompleksen proces, pri katerem sodelujejo topni posredniki, krvne celice, ekstracelularni matriks in parakrini dejavniki. Kljub poznovanju bioloških mehanizmov celjenja ran, je zdravljenje ran v medicini še vedno težavno in dolgotrajno. Težave pri zdravljenju predstavljajo predvsem rane, ki se celijo počasi, kot so kronične, inficirane ali globoke rane (Singer in Clark, 1999). Zaradi težavne terapije, se pojavljajo potrebe po razvoju novih načinov zdravljenja ran. Raziskave kažejo, da na celjenje ran ugodno vplivajo matične celice in topni dejavniki, ki jih izločajo. Z uporabo rastnih dejavnikov, ki jih proizvajajo matične celice, bi lahko izboljšali trenutne terapije in na ta način pospešili celjenje ran. Ker pa ima uporaba matičnih celic kar nekaj omejitev, se zdi uporaba medija, v katerem so rasle matične celice in vsebuje dejavnike, ki jih sproščajo matične celice, dobra alternativa uporabi matičnih celic v terapevtske namene (Jayaraman in sod., 2013).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

V Evropski uniji v bolnišnicah letno obravnavajo več kot 4 milijone pacientov z ranami. Do petdeset odstotkov vseh hospitaliziranih bolnikov predstavljajo bolniki z ranami, od katerih jih ima 60 % kronične rane. Pogoste so okužbe kirurških ran, ki vodijo v nastanek kroničnih ran, saj se pojavijo pri 3 % vseh kirurških posegov. Nastanek kroničnih ran je povezan s starostjo, zato bodo zaradi staranja prebivalstva Evropske unije kronične rane postale še večja obremenitev za zdravstveni sistem (Posnett in sod., 2009).

1.2 CILJI NALOGE

V magistrskem delu smo želeli s pregledom svetovno dostopne literature identificirati rastne dejavnike, ki jih izločajo matične celice, in pozitivno vplivajo na celjenje ran. Izbrane rastne dejavnike smo želeli z uporabo metod molekularne biologije izraziti v sesalskih celicah ter njihovo izražanje preveriti z uporabo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo, western prenosom in encimskoimunskimi testi.

V nalogi smo želeli ovrednotiti vpliv posameznih rastnih dejavnikov na hitrost rasti in migracijo fibroblastov v pogojih *in vitro*.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Rastni dejavniki EGFL7, FGF-2, IGF-I, PDGF-B, TGF- β 1 in VEGF-A se bodo izražali v prehodno in stabilno transficiranih sesalskih celicah.
- Izraženi rastni dejavniki bodo pozitivno vplivali na model zapiranja rane v pogojih *in vitro*.
- Identificirali bomo razlike v vplivu različnih rastnih dejavnikov na model zapiranja rane v pogojih *in vitro*.
- Hitrost zapiranje rane v pogojih *in vitro* bo odvisna od koncentracije dodanih rastnih dejavnikov.

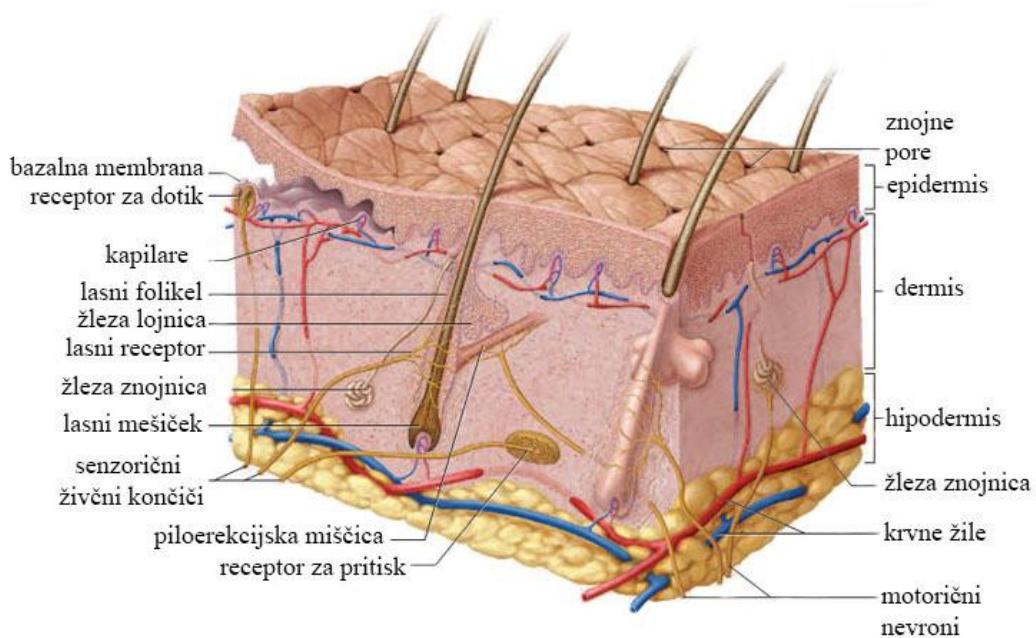
2 PREGLED OBJAV

2.1 KOŽA

Koža je sestavljena iz dveh plasti: epidermisa (povrhnjice) in dermisa (usnjice). Pod dermisom se nahaja še ena plast vezivnega tkiva imenovana hipodermis, ki ni del kože, vendar ga običajno preučujejo v povezavi z njo (Saladin, 2009).

2.1.1 Funkcija kože

Koža predstavlja bariero med telesom in okoljem. Koža služi kot zaščita pred patogeni, preprečuje nenadzorovan vstop ali izstop vode in nudi zaščito pred ultravioletnim sevanjem. Koža je tudi naš največji čutni organ. Na njej se nahajajo številni različni receptorji, s katerimi zaznavamo toploto, hlad, dotik, teksturo, pritiske, vibracije in poškodbe tkiva (slika 1). Koža ima tudi pomembno vlogo pri termoregulaciji, v njej pa prihaja tudi do sinteze prvih intermediatov v sintezi vitamina D. Koža je najbolj izpostavljen del telesa in doživi največ poškodb izmed vseh organov. Zato je celjenje kože dobro organizirno v kompleksnem procesu, ki mora za ohranjanje normalne fiziologije celotnega organizma potekati nemoteno (Saladin, 2009).

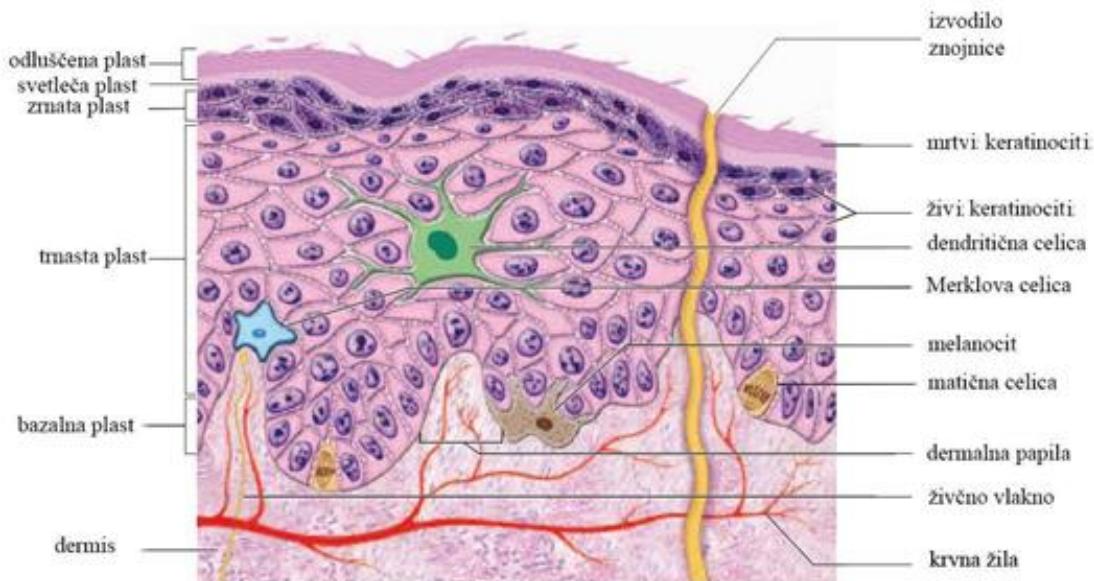


Slika 1: Struktura kože in subkutanega tkiva (Saladin, 2009)

2.1.2 Epidermis

Epidermis sestavlja celice ploščatega epitelija. Na samem vrhu se nahajajo mrtve poroženele celice keratinociti, ki predstavljajo glavno bariero kože. Keratinociti v zgornjem sloju kože vsebujejo velike količine keratina in so prekriti s hidrofobnimi glikolipidi, kar preprečuje izgubo vode iz telesa in vdor mikroorganizmov. Tako kot v drugih epitelnih tkivih v epidermisu ni krvnih žil, zato hranila do celic prehajajo z difuzijo. Epidermis sestavlja pet tipov celic: matične celice, keratinociti, melanociti, Merklove celice in Langerhanske (dendritične) celice (slika 2). Glavne celice v epidermisu so keratinociti, ki sintetizirajo keratin in predstavljajo zaščitni sloj kože. Melanociti v epidermisu sintetizirajo pigment melanin, ki ščiti DNA pred ultravioletskim sevanjem. Merklove celice služijo kot receptorji za tip, dendritične celice pa služijo kot prva obramba ob vdoru toksinov, patogenov ali drugih tujkov v kožo (Saladin, 2009).

Celice v epidermisu glede na starost in morfologijo v posamezni plasti razdelimo v pet kon: stratum basale (bazalna plast), stratum spinosum (trnasta plast), stratum granulosum (zrnata plast), stratum lucidum (svetleča plast) in stratum corneum (odluščena plast) (slika 2). Keratinociti nastajajo globoko v dermisu (stratum basale) z delitvijo matičnih celic, nato pričnejo migrirati proti zunanjosti kože in se na koncu odluščijo (Saladin, 2009).



Slika 2:Prikaz zgradbe epidermisa (Saladin, 2009)

Med epitelnim tkivom in pod njim ležečimi tkivi se nahaja tanka plast imenovana basalna membrana. Sestavljena je iz kolagena, adhezivnih glikoproteinov (laminini in fibronektini) in heparin sulfata. Naloga basalne membrane je, da povezuje epitelne celice s spodaj ležečimi tkivi (Saladin, 2009).

2.1.3 Dermis

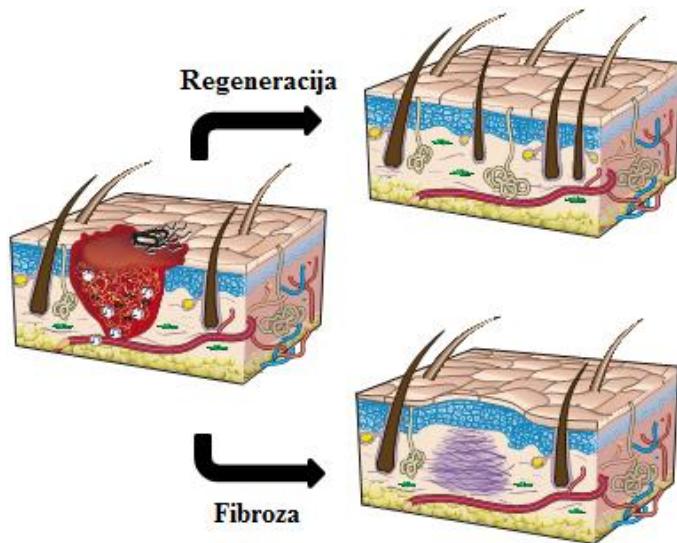
Pod epidermisom se nahaja druga plast kože imenovana dermis (slika 1). Večinski del dermisa predstavljajo kolagenska vlakna, poleg njih pa se v dermisu nahaja tudi elastin, ki daje koži elastičnost, fibroblasti in druge celice (makrofagi, levkociti, plazemske celice, mastociti in adipociti). Področje dermisa je dobro prekrnjeno, v njem se nahajajo žleze znojnice in lojnice ter prosti živčni končiči. V dermisu so zasidrani tudi lasni mešički (Chen in sod., 2009; Saladin, 2009).

2.1.4 Hipodermis

Pod obema plastema kože se nahaja še ena plast imenovana hipodermis ali subkutano tkivo, ki pripenja kožo na spodaj ležeča tkiva (slika 1). Meja med dermisom in hipodermisom ni vedno jasna. Hipodermis je dobro prekrnjavljen in vsebuje večje število maščobnih celic. Del hipodermisa, ki ga sestavljajo predvsem maščobne celice, imenujemo podkožno maščobno tkivo, katerega funkcije so shranjevanje energije, toplotna izolacija (Saladin, 2009) ter tudi druge pomembne metabolne endokrine in imunske funkcije (Ibrahim, 2010).

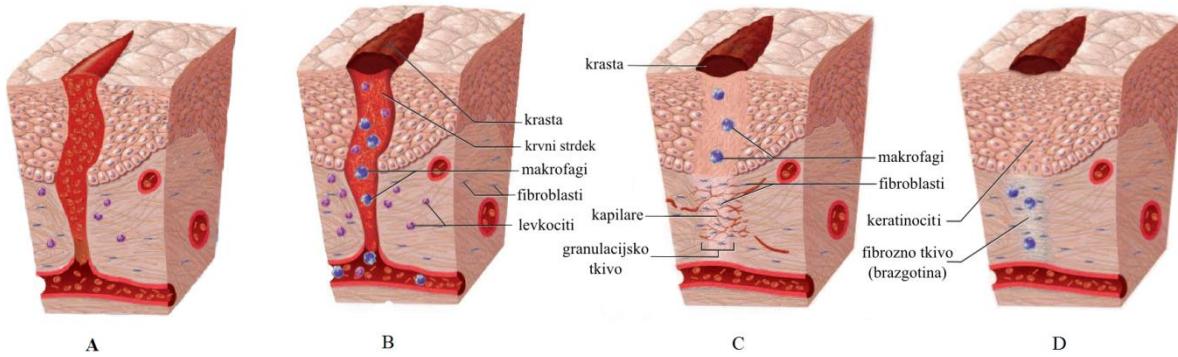
2.2 CELJENJE RAN

Poškodovano tkivo kože se lahko obnovi preko regeneracije ali pa preko fibroze (slika 3). V procesu regeneracije pride do popolne obnove tkiva, ki ohrani vse svoje funkcije. Pri fibrozi pa na poškodovanem mestu nastane brazgotina, ki je v večji meri sestavljena iz kolagena. Brazgotina sicer obnovi integriteto kože, vendar pa ne obnovi njene normalne funkcije. Pri celjenju globokih ran sta običajno prisotna tako proces regeneracije kot tudi fibroze (Saladin, 2009).



Slika 3: Prikaz celjenja preko regeneracije ali fibroze (Gurtner in sod., 2008)

Celjenje ran je dinamičen proces, pri katerem sodelujejo topni mediatorji, krvne celice, zunajcelični matriks in parenhimske celice. Celjenje ran je sestavljeno štirih faz (slika 4): hemostaze, faze vnetja, faze proliferacije in faze preoblikovanja tkiva, ki se med seboj časovno prekrivajo (Singer in Clark, 1999). Do aktivacije popravljalnih mehanizmov na mestu rane pride v nekaj trenutkih po nastanku poškodbe, zaradi vpliva sproščanja različnih rastnih faktorjev, citokinov in drugih topnih molekul, ki se nahajajo v krvi in serumu (Gurtner in sod., 2008; Werner in Grose, 2003).



Slika 4: Prikaz različnih faz celjenja rane A) hemostaza, B) faza vnetja, C) faza proliferacije, D) faza preoblikovanja tkiva (Saladin, 2009)

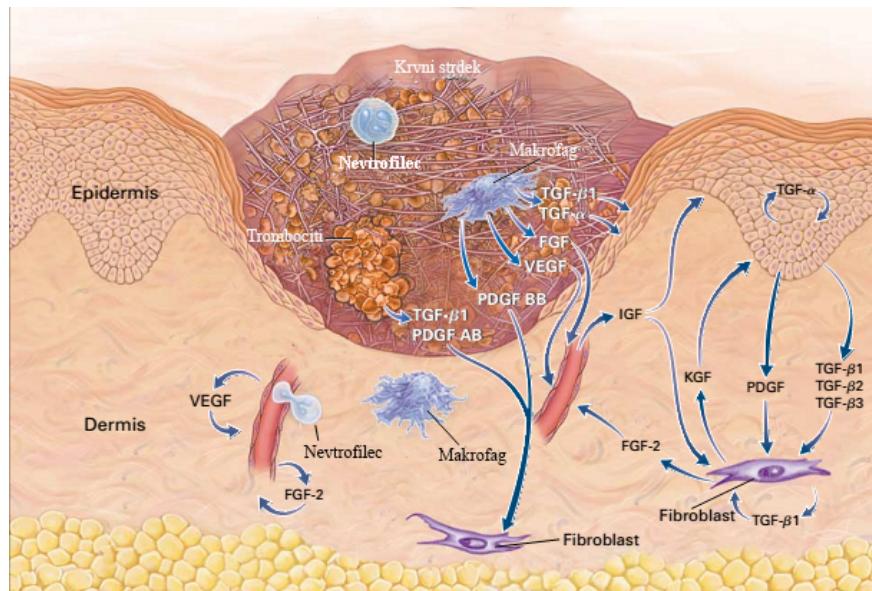
2.2.1 Hemostaza

Ob nastanku poškodbe prične kri iztekat v področje rane (slika 4 A). V področje rane tako pride krvna plazma skupaj s protitelesi, krvnimi celicami in koagulacijskimi proteini (Saladin, 2009). Na mestu rane se sproži koagulacijska kaskada, ki vodi v nastanek krvnega strdka. Krvni strdek je sestavljen iz prečno povezanih fibrinskih vlaken in proteinov zunajceličnega matriksa (ECM), ki skupaj tvorijo fibrinski matriks, v katerega so ujete različne krvne celice in trombociti. Fibrinski matriks zaščiti področje rane pred zunanjimi vplivi, hkrati pa služi kot ogrodje, ki ga kmalu po nastanku naselijo nevtrofilci, monociti in druge vnetne celice. Te celice preprečujejo okužbo, odstranijo odmrlo tkivo in sintetizirajo različne rastne faktorje, ki pripomorejo k celjenju rane (Chen in sod., 2009; Singer in Clark, 1999; Werner in Grose, 2003). Hkrati različne mediatorje celjenja sproščajo tudi trombociti v krvnem strdku (Barrientos in sod., 2008).

2.2.2 Vnetje

V fazi vnetja pride do sproščanja mnogih rastnih dejavnikov in citokinov s strani različnih celic (slika 5). Vnetje se prične, ko pod vplivom različnih rastnih dejavnikov v kombinaciji z zunajceličnimi proteini in IL-1 pride do migracije nevtrofilcev in monocitov na področje rane (Singer in Clark, 1999). Nevtrofilci pričnejo migrirati na področje rane nekaj minut po nastanku rane. Nevtrofilci počistijo območje rane in hkrati sproščajo tudi različne provnetne citokine, ki aktivirajo keratinocite in fibroblaste v bližini rane (Martin, 1997). Makrofagi na področju rane pričnejo sproščati rastne dejavnike, kot so rastni dejavniki iz trombocitov

(PDGF), vaskularno endotelijski rastni dejavniki (VEGF), transformirajoči rastni dejavnik alfa (TGF- α), transformirajoči rastni dejavnik beta (TGF- β) in inzulinu podobni rastni dejavnik 1 (IGF-I). Hkrati z rastnimi dejavniki sproščajo tudi provnetne citokine (IL-1, IL-6). Rastni dejavniki, ki jih izločajo monociti in makrofagi so ključnega pomena za prehod iz vnetne faze v fazo proliferacije in regeneracijo tkiva (Barrientos in sod., 2008; Gurtner in sod., 2008; Singer in Clark, 1999).



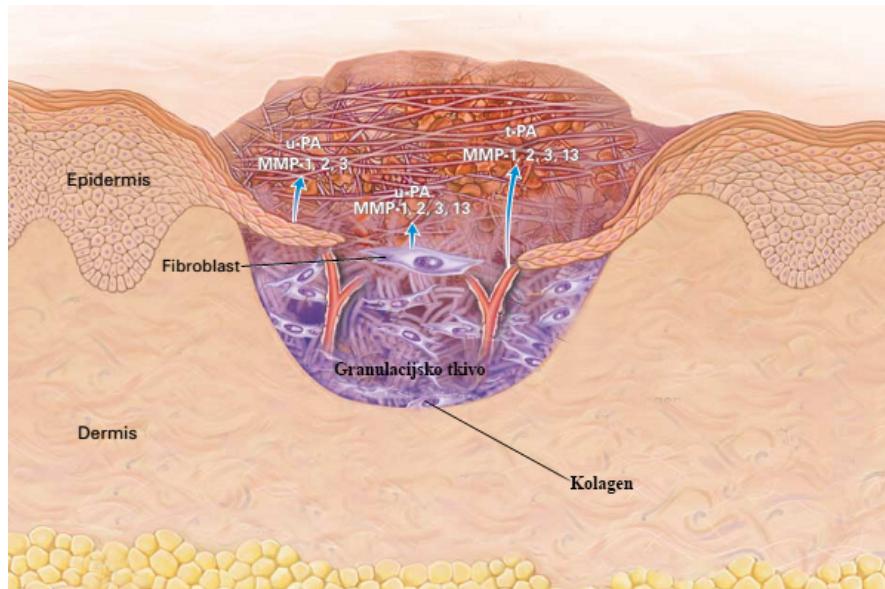
Slika 5: Shematski prikaz dogajanja med vnetno fazo celjenja (Singer in Clark, 1999)

2.2.3 Proliferacija

V fazi proliferacije pride do angiogeneze, nalaganja kolagena, tvorbe granulacijskega tkiva, epitelizacije in kontrakcije rane (slika 6). Faza proliferacije celic se prične, ko pod vplivom rastnih dejavnikov, ki jih izločajo vnetne celice v rani, na mesto poškodbe prično migrirati fibroblasti in žilno-endotelijske celice (Barrientos in sod., 2008).

Te celice na mestu poškodbe pričnejo s proizvodnjo velikih količin zunajceličnega matriksa, katerega glavna komponenta je kolagen. Zunajcelični matriks počasi prične nadomeščati fibrinski matriks znotraj rane. V področje rane hkrati pričnejo prodirati novo nastale kapilarje, ki ishemično področje rane pričnejo oskrbovati s hrани in kisikom. Tako nastalo tkivo, ki je mešanica fibroblastov, miofibroblastov, kolagena in prepredeno s kapilarami, imenujemo granulacijsko tkivo. V primeru normalnega celjenja se granulacijsko tkivo formira v nekaj dneh po poškodbi. Makrofagi v granulacijskem tkivu sproščajo rastne dejavnike, ki

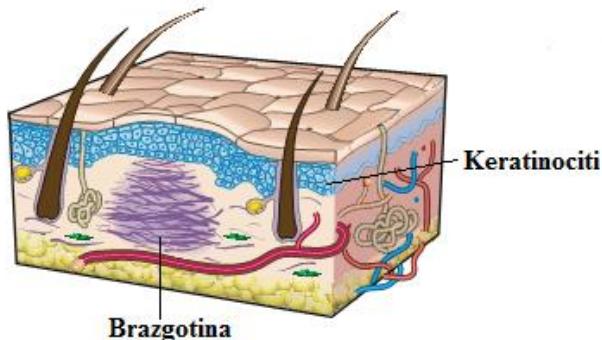
pospešujejo celjenje, fibroblasti producirajo novi zunajcelični matriks, ki daje podporo celicam, krvne žile pa celice oskrbujejo z nutrienti in kisikom. Po formaciji granulacijskega tkiva se prične tudi migracija keratinocitov z roba rane in njihova proliferacija na površju granulacijskega tkiva. Obenem miofibroblasti pričnejo s sintezo aktina, ki povzroči krčenje rane, in tako zmanjšuje njeni površini (Barrientos in sod., 2008; Chen in sod., 2009; Gurtner in sod., 2008; Singer in Clark, 1999; Werner in Grose, 2003).



Slika 6: Prikaz rane v fazi proliferacije (Singer in Clark, 1999)

2.2.4 Preoblikovanje tkiva

Preoblikovanje tkiva je zadnja faza celjenja rane. Prične se 2 do 3 tedne po poškodbi in lahko traja leto ali več. V tej fazi celjenja rane granulacijsko tkivo nadomestijo fibrinska in elastanska vlakna. Na novo ogrodje se pričnejo nalagati proteoglikani in glikoproteini. Temu sledi preoblikovanje tkiva, ki vključuje razgradnjo starega in sintezo novega kolagena pod vplivom TGF- β . Makrofagi, epidermalne celice, endotelijalne celice in fibroblasti pričnejo sproščati proteolitične encime (matriks metaloproteaze – MMP), ki razgradijo star kolagen, kar olajša migracijo celicam iz roba v sredino rane. Ko se področje rane zapolni s kolagenskim matriksom in aktinskimi vlakni, površino pa zapolnijo keratinociti, ki obnovijo kožno bariero, nastane končni produkt celjenja rane – brazgotina, v primeru regeneracije pa novo regenerirano tkivo (Barrientos in sod., 2008; Gurtner in sod., 2008; Singer in Clark, 1999).



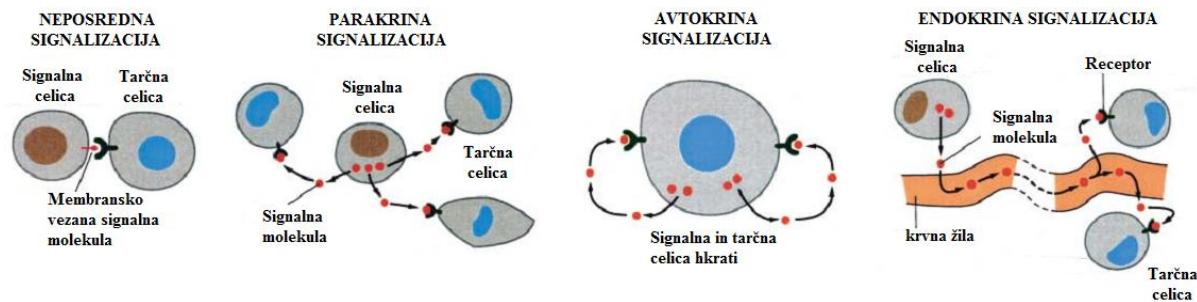
Slika 7: Prikaz rane v fazi preoblikovanja tkiva (Gurtner in sod., 2008)

2.3 RASTNI DEJAVNIKI

Uspešnost celjenja rane je odvisna od kompleksne signalizacije rastnih dejavnikov, citokinov in kemokinov. Večina rastnih dejavnikov se sintetizira v transmembranski obliki, zato je za njihovo sproščanje potrebna proteoliza. Vendar pa so vezave na receptorje sposobne tudi transmembranske oblike proteina, zato rastni dejavniki lahko na tarčne celice vplivajo parakrino, avtokrino, endokrino in preko neposrednega stika celic. Njihova vezava na specifične receptorje sproži kaskado molekularnih dogodkov, kar vodi v aktivacijo različnih signalnih poti v celici (Barrientos in sod., 2008).

Preglednica 1: Citokini, ki vplivajo na celjenje ran (Barrientos in sod., 2008; Singer in Clark, 1999)

Citokin	Glavni vir	Glavna funkcija
Družina epidermalnih rastnih dejavnikov		Regeneracija epidermisa in mezhimskega tkiva
Epidermalni rastni dejavnik (EGF)	Trombociti	Migracija in proliferacija različnih celičnih tipov
Transformirajoči rastni dejavnik α (TGF- α)	Makrofagi, epidermalne celice	Migracija in proliferacija različnih celičnih tipov
Heparin vezalni epidermalni rastni dejavnik (HBEGF)	Makrofagi	Migracija in proliferacija različnih celičnih tipov
Družina fibroblastnih rastnih dejavnikov		Vaskularizacija rane, reepitelizacija
Fibroblastni rastni dejavniki (FGF)	Makrofagi, endotelijске celice	Angiogeneza, formacija granuloznega tkiva in proliferacija fibroblastov
Keratinocitni rastni dejavnik (KGF)	Fibroblasti	Proliferacija in migracija epidermalnih celic
Družina transformirajočih rastnih dejavnikov		Reepitelizacija, fibroza in povečanje natezne trdnosti
Transformirajoča rastna dejavnika $\beta 1$ in $\beta 2$ (TGF- $\beta 1$ in TGF- $\beta 2$)	Trombociti, makrofagi	Migracija epidermalnih celic, kemotaksa fibroblastov in makrofagov, sinteza in preoblikovanje ECM
Transformirajoči rastni dejavnik $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$)	Makrofagi	Zmanjševanje brazgotine
Družina rastnih dejavnikov iz trombocitov (PDGF)	Trombociti, makrofagi, epidermalne celice	Proliferacija in kemotaksa fibroblastov, kemotaksa in aktivacija makrofagov
Družina vaskularno endotelijskih rastnih dejavnikov (VEGF)	Epidermalne celice, makrofagi	Angiogeneza
Dejavnik tumorske nekroze α (TNF-α)	Nevtrofilci	Ekspresija različnih rastnih dejavnikov
Interlevkin 1 (IL1)	Nevtrofilci	Ekspresija različnih rastnih dejavnikov
Inzulinu podobni rastni dejavnik I (IGF-I)	Fibroblasti, epidermalne celice	Reepitelizacija in formacija granuloznega tkiva



Slika 8: Mehanizmi delovanja rastnih dejavnikov (Braun in sod., 2002)

2.3.1 Družina epidermalnih rastnih dejavnikov

Družino epidermalnih rastnih dejavnikov sestavlja 13 predstavnikov in je najboljše okarakterizirana skupina molekul, ki sodelujejo pri celjenju ran. Vsi predstavniki družine epidermalnih rastnih dejavnikov se sintetizirajo v membransko vezani obliki, za njihovo sproščanje pa je potrebna proteoliza (Barrientos in sod., 2008; Werner in Grose 2003; Yu in sod., 2010).

Glavni dejavniki iz družine epidermalnih rastnih dejavnikov, ki sodelujejo pri celjenju ran so epidermalni rastni dejavnik (EGF), transformirajoči rastni dejavnik α (TGF- α) in heparin vezalni rastni dejavnik (HBEGF). Rastni faktorji iz družine epidermalnih rastnih faktorjev delujejo preko vezave na specifične transmembranske receptorje, ki prepoznavajo epidermalne rastne dejavnike (EGFR). Prepoznavanje liganda s strani receptorja vodi v aktivacijo številnih poti, ki pospešujejo celično migracijo in proliferacijo (Barrientos in sod., 2008; Werner in Grose, 2003; Yu in sod., 2010).

EGF sproščajo trombociti, makrofagi in fibroblasti in parakrino delujejo na epitelne celice. *In vitro* raziskave so pokazale, da povišanje izražanja EGF ob akutni poškodbi vpliva na proliferacijo in migracijo keratinocitov, zaradi česar se pospeši reepitelizacija in zapiranje rane (Barrientos in sod., 2008; Yu in sod., 2010).

Transformirajoči rastni dejavnik α (TGF- α) vpliva na migracijo in proliferacijo epitelnih celic in sodeluje pri zgodnjih fazah reepitelizacije. Pri celjenju ran nima pomembne vloge, saj njegovo odsotnost lahko telo kompenzira z drugimi rastnimi dejavniki (Werner in Grose, 2003; Yu in sod., 2010).

Heparin vezalni rastni dejavnik (HBEGF) vpliva na proliferacijo in migracijo keratinocitov in fibroblastov in ima pomembno vlogo pri reepitelizaciji in tvorbi granulognega tkiva (Werner in Grose, 2003; Yu in sod., 2010).

2.3.2 Družina fibroblastnih rastnih dejavnikov

Družina fibroblastnih rastnih faktorjev vsebuje 23 različnih dejavnikov. Med njimi imajo največji vpliv na celjenje ran fibroblastni rastni dejavniki 2, 7 in 10 (FGF-2, FGF-7 in FGF-10). Fibroblastne rastne faktorje sproščajo fibroblasti, keratinociti, endotelijalne celice, celice gladkih mišic, hondrociti in mastociti (Barrientos in sod., 2008; Werner in Grose, 2003). Fibroblastni rastni faktorji stimulirajo proliferacijo mezodermalnih, ektodermalnih in endodermalnih celic. Edina izjema je FGF-7 (keratinocitni rastni faktor, KGF), ki deluje le na epitelne celic. Fibroblastni rastni dejavniki dodatno vplivajo tudi na migracijo fibroblastov, keratinocitov in drugih tarčnih celic (Werner in Grose, 2003).

Raziskave kažejo, da ima pri celjenju ran pomembno vlogo FGF-2, saj vpliva na proliferacijo fibroblastov in keratinocitov. Hkrati vpliva tudi na sintezo in depozit zunajceličnega matriksa ter povečuje mobilnost keratinocitov in fibroblastov in tako posledično vpliva na formacijo granulognega tkiva, reepitelizacijo in preoblikovanje tkiva. V kroničnih ranah je koncentracija FGF-2 običajno nizka (Barrientos in sod., 2008; Werner in Grose, 2003).

2.3.3 Družina transformirajočih rastnih dejavnikov

V družino transformirajočih rastnih dejavnikov spadajo transformirajoči rastni dejavniki $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 3$ (TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$ in TGF- $\beta 3$) (Barrientos in sod., 2008; Werner in Grose, 2003).

TGF- $\beta 1$ sodeluje pri vseh fazah celjenja rane. Ob nastanku krvnega strdka, ga pričnejo sproščati trombociti. Povišanje koncentracije TGF- $\beta 1$ na mestu poškodbe privlači nevtrofilce, makrofage in fibroblaste, ki na mestu rane tudi sami pričnejo s produkcijo TGF- $\beta 1$ (Werner in Grose, 2003). Pod vplivom TGF- $\beta 1$ pride do diferenciacije fibroblastov v miofibroblaste. Prav tako TGF- $\beta 1$ sodeluje pri formaciji granulognega tkiva, saj vpliva na povečano izražanje proteinov, ki sestavljajo zunajcelični matriks, hkrati pa vpliva tudi na povečano izražanje VEGF. V fazi preoblikovanja tkiva, TGF- $\beta 1$ sodeluje pri produkciji kolagena in je potencialni inhibitor metaloproteinaz (MMP), ki razgrajujejo kolagen. Pri kroničnih ranah so koncentracije TGF- $\beta 1$ znatno zmanjšane. Razlog zato je lahko razgradnja TGF- $\beta 1$ s strani proteolitičnih encimov, predvsem s strani elastaz (nevtrofilci), ali pa oviranje njihove aktivnosti zaradi prisotnosti fibrogena ali albumina (Barrientos in sod., 2008; Yu in sod., 2010).

2.3.4 Družina rastnih dejavnikov iz trombocitov

Družino rastnih dejavnikov iz trombocitov (Platlet derived growth factors; PDGF) sestavljajo homo in hetero dimerni rastni dejavniki, med njimi rastni dejavnik iz trombocitov A (PDGF-A), rastni dejavnik iz trombocitov AB (PDGF-AB), rastni dejavnik iz trombocitov B (PDGF-B), rastni dejavnik iz trombocitov C (PDGF-C) in rastni dejavnik iz trombocitov D (PDGF-D). Rastne dejavnike iz trombocitov sproščajo trombociti, makrofagi, celice krvnih žil, fibroblasti in keratinociti (Barrientos in sod., 2008; Werner in Grose, 2003).

Rastni dejavnik iz trombocitov sodelujejo pri vseh fazah celjenja ran. Ob nastanku poškodbe trombociti na mestu rane pričnejo sproščati PDGF-B. To stimulira proliferacijo nevtrofilcev, makrofagov, fibroblastov, gladkih mišičnih celic ter povzroči njihovo migracijo na mesto poškodbe, hkrati pa aktivira sekrecijo TGF- β v makrofagih. PDGF vplivajo na proliferacijo fibroblastov, njihovo diferenciacijo v miofibroblaste in posledično na produkcijo zunajceličnega matriksa. V procesu reepitelizacije PDGF vpliva na zvišanje produkcije inzulinu podobnega rastnega dejavnika 1 (IGF-I). PDGF v ishemičnem okolju v kombinaciji s hipoksijo vpliva tudi na povečanje izražanja VEGF rastnega dejavnika in tako vpliva na angiogenezo (Barrientos in sod., 2008; Werner in Grose, 2003).

V kroničnih ranah so koncentracije PDGF nižje, kot v akutnih ranah. Nizke koncentracije so najverjetnejše posledica razgradnje PDGF s strani MMP (Barrientos in sod., 2008).

2.3.5 Vaskularno endotelijski rastni dejavniki

V družino vaskularno endotelijskih rastnih dejavnikov sodijo: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, in rastni dejavnik posteljice. VEGF-A nastaja v endotelijskih celicah, keratinocitih, fibroblastih, gladkih mišičnih celicah, nevtrofilcih in makrofagih. Preko vezave na specifične receptorje vpliva na proliferacijo in diferenciacijo endotelijskih celic ter na organizacijo krvnih žil (Barrientos in sod., 2008; Werner in Grose, 2003).

VEGF-A na področju rane vpliva na angiogenezo in migracijo ter proliferacijo endotelijskih celic in posledično na formacijo granulognega tkiva. Njegove koncentracije so v akutnih ranah znižane. Hipoksija tkiva na področju rane je eden glavnih stimulusov za pričetek sproščanja VEGF-A s strani monocitov, fibroblastov, keratinocitov, miocitov in endotelijskih celic. VEGF-A vpliva tudi na limfoangiogenezo na področju rane (Barrientos in sod., 2008; Werner in Grose, 2003).

2.3.6 Inzulinu podobni rastni dejavnik

Inzulinu podobni rastni dejavnik ena (IGF-I) je multifunkcijski regulatorni peptid, ki je strukturno podoben proinzulinu. Preko vezave na receptorje IGF-I vpliva na proliferacijo, migracijo, diferenciacijo in preživetje različnih celičnih tipov. Delujejo parakrino, avtokrino in endokrino. Prisotnost IGF-I poveča kemotaksco fibroblastov, vendar ne vpliva na migracijo keratinocitov. Celice kože v normalnih fizioloških pogojih izražajo zelo malo IGF-I ter njegovih receptorjev, ob poškodbi pa se število receptorjev in sama produkcija IGF-I močno povečata. Dodatek izoliranega IGF-I, v kombinaciji z drugimi rastnimi dejavniki deluje sinergistično in pospešuje hitrost celjenja rane, kar dokazuje njegovo vlogo pri celjenju ran (Werner in Grose, 2003; Yu in sod., 2010).

2.3.7 Ostali dejavniki

Rastni dejavnik vezivnega tkiva (CTGF) je protein, ki ga izločajo fibroblasti. Vpliva na proliferacijo, migracijo, adhezijo in preživetje endotelijskih celic, hkrati pa vpliva tudi na migracijo in proliferacijo fibroblastov. Njegovo izražanje je povečano ob nastanku rane, sodeluje v procesih formacije granulognega tkiva, reepitelizacije in pri remodeliranju tkiva (Barrientos in sod., 2008).

Granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (ang. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor - GM-CSF) ima pomembno vlogo v vnetni fazi zdravljenja rane, saj vpliva na povečanje števila nevtrofilcev in njihovo aktivnost v rani. GM-CSF vpliva tudi na proliferacijo keratinocitov in posledično izboljša reepitelizacijo (Barrientos in sod., 2008).

Družina razpršenih dejavnikov (ang. Scatter factors) sestoji iz dveh članov: hepatocitnega rastnega faktorja (HGF) in makrofage-stimulirajočega proteina (MSP). Oba dejavnika vplivata na proliferacijo različnih celičnih tipov v koži (Werner in Grose, 2003).

2.3.8 Vnetni citokini

Poleg rastnih dejavnikov, na celjenje ran vplivajo tudi citokini. Citokini so molekule, ki imajo običajno vlogo pri imunskega odziva, vendar delujejo tudi na neimunske celice. Med njih prištevamo interlevkine, limfokine in sorodne molekule, kot so dejavniki tumorske nekroze in interferoni (Werner in Grose, 2003).

V vnetni fazni celjenja rane so prisotni citokini interlevkin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) in dejavniki tumorske nekroze α (TNF- α). IL-1 producira nevtrofilci, makrofagi in keratinociti. Parakrino deluje na fibroblaste, kjer spodbuja sekrecijo FGF, hkrati pa avtokrino deluje tudi na migracijo in proliferacijo keratinocitov. IL-1 β v visokih koncentracijah zaviralno vpliva na celjenje ran. IL-6 producira nevtrofilci in monociti. Deluje kot kemoatraktant za nevtrofilce, vpliva pa tudi na proliferacijo keratinocitov. TNF- α v nizkih koncentracijah posredno vpliva na celjenje rane, saj stimulira makrofage, da producira večje količine rastnih dejavnikov. Vendar pa TNF- α v višjih koncentracijah negativno vpliva na celjenje ran, saj zavira sintezo zunajceličnega matriksa in hkrati povečuje sintezo MMP (Barrientos in sod., 2008).

V kroničnih ranah je pogosto prisotna tudi okužba, zato sklepajo, da kronično vnetje rane povzroči, da celice sproščajo velike količine TNF- α in IL-1, ki skupaj vplivata na povečano produkcijo MMP, kar še dodatno negativno vpliva na celjenje rane (Barrientos in sod., 2008).

2.4 MOTNJE V CELJENJU RAN

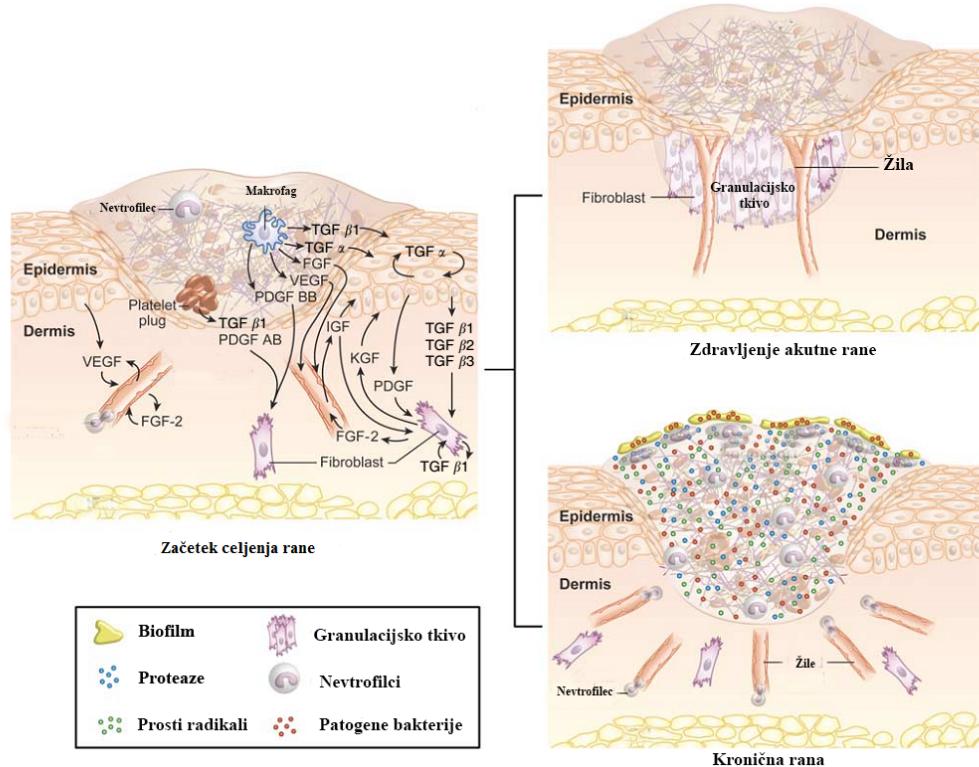
Motnje v celjenju ran so lahko posledica prepočasnega celjenja (kronične rane) ali prehitrega celjenja. V primeru prehitrega celjenja pride do prevelikega odlaganja zunajceličnega matriksa in pretirane rasti celic kar vodi v nastanek hipertrofičnih ali keloidnih brazgotin (Gurtner in sod., 2008).

Glede na čas potreben za celjenje, ločimo dva tipa ran: akutne in kronične rane. Akutne rane so poškodbe kože, ki nastanejo kot posledica določene travme ter se zacelijo po normalnem mehanizmu celjenja rane v primernem časovnem okviru. Akutna rana postane kronična, ko telo ni zmožno odpraviti poškodbe in se zato rana ne zaceli po normalnem procesu celjenja v določenem časovnem okviru. Razlike med celjenjem akutne in kronične rane so prikazane na sliki 9 (Chen in sod., 2009).

2.4.1 Kronične rane

Kronične rane pogosto nastanejo zaradi ponavljače travme na mestu poškodbe ali pa zaradi podaljšanja katere od faz zdravljenja rane zaradi infekcije, hipoksije tkiva, nekroze ali visoke ravni vnetnih citokinov. K nastanku kroničnih ran dodatno prispevajo različna bolezenska stanja kot so diabetes, povišan krvni tlak, žilna insuficienca, opeklne, stres, debelost in starost (Guo in Dipietro, 2010; Lau in sod., 2009; Maxson in sod., 2012). Biološki označevalec kronične rane je velika koncentracija nevtrofilcev, ki so odgovorni za kronično vnetje, hkrati pa sproščajo kolagenaze in elastaze, ki razkrajajo zunajcelični matriks (Maxson in sod., 2012).

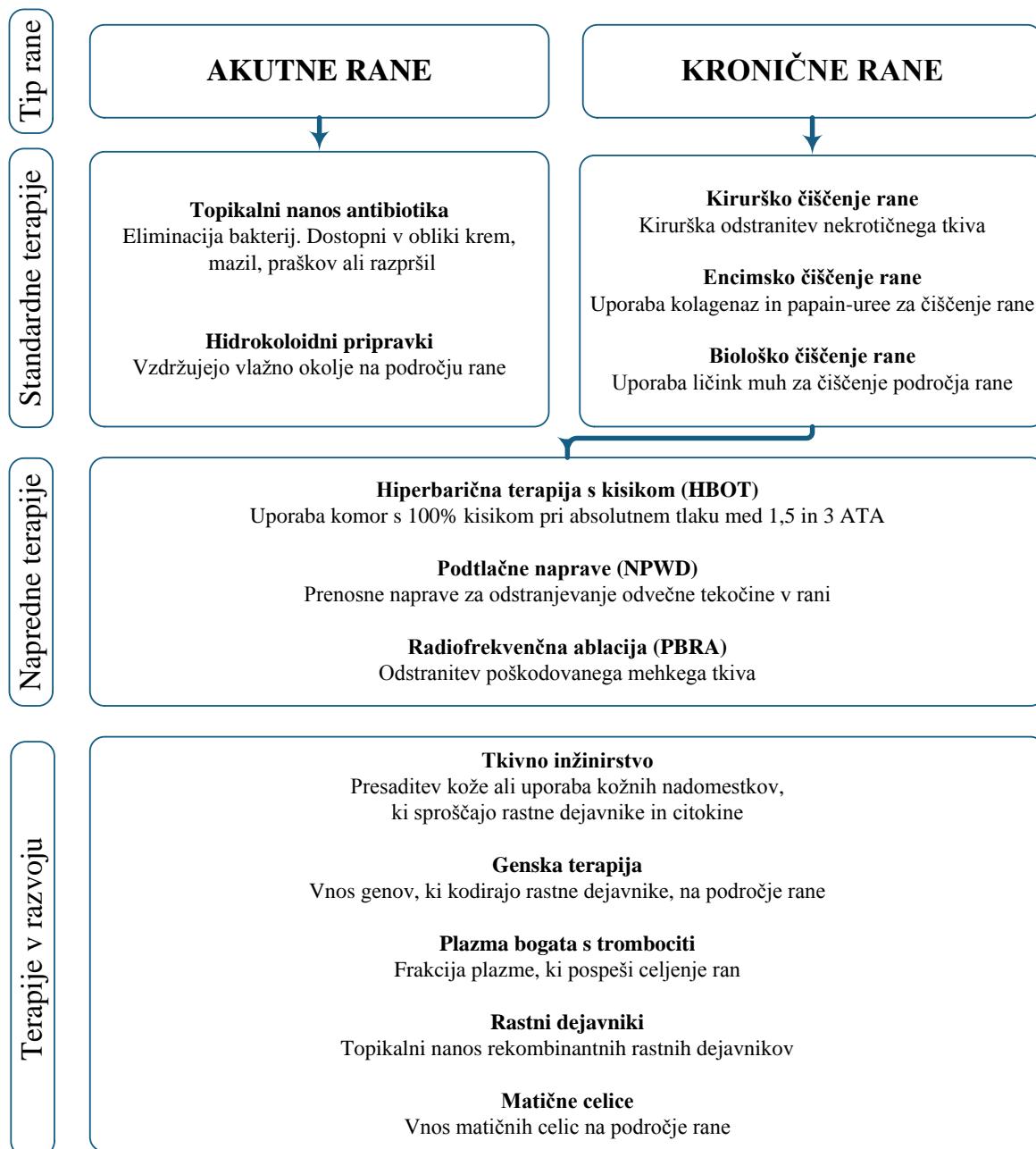
Rastni dejavniki, citokini in kemokini so ključnega pomena za normalno celjenje rane. V akutnih ranah so rastni dejavniki prisotni v vseh fazah, kar omogoči organizacijo celic v rani in zdravljenje rane ter povrnitev normalne fiziološke funkcije kože (Barrientos in sod., 2008). V nasprotju s tem, pa so koncentracije rastnih dejavnikov v kroničnih ranah nižje kot v akutnih ranah, kar otežuje njihovo celjenje. Znižana koncentracija rastnih dejavnikov v kroničnih ranah je običajno posledica njihove degradacije s strani proteinaz, ki so lahko endogenega ali bakterijskega izvora (slika 9) (Crovetti, 2004).



Slika 9: Razlike v fiziologiji normalne in kronične rane (Clark in sod., 2007)

2.4.2 Sodobne strategije terapije celjenja ran

Kožne rane kljub dobremu poznavanju celičnega in molekularnega dogajanja med celjenjem ostajajo velik zdravstveni problem. Glavni razlog je, da še ne poznamo učinkovitih terapij, s katerimi bi lahko zdravili kronične in globoke rane. Danes so v uporabi številne terapije, ki izboljšajo in skrajšajo celjenje ran. Klasična pristopa k celjenju ran sta predvsem uporaba antibiotikov in različnih pripravkov za čiščenje rane (Jayaraman in sod., 2013). Kot podpora ali nadomestek standardne terapije pa se pojavljajo tudi napredne terapije, kot na primer genska terapija (Eming in sod., 2007; Peng in sod., 2012), uporaba plazme, bogate s trombociti (Yang in sod., 2011), uporaba rastnih dejavnikov, vezanih na nosilce (Bhang in sod., 2011), presaditve kože ali uporaba kožnih nadomestkov (Clark in sod., 2007) in matične celice (Lee in sod., 2009). V zadnjem času so se kot zelo obetavne za potencialno terapevtsko uporabo kežejo matične celice (Jayaraman in sod., 2013). Na sliki 10 so prikazane klasične in napredne terapije za celjenje ran.



Slika 10: Shematski prikaz terapij za izboljšanje celjenja ran (Jayaraman in sod., 2013)

2.5 MATIČNE CELICE

Matične celice so nediferencirane celice, ki se lahko diferencirajo v različne celične tipe. Matične celice imajo različne stopnje plastičnosti, ki določa, v koliko različnih celičnih tipov se lahko diferencirajo. Glede na izvor matičnih celic, ločimo embrionalne matične celice in odrasle matične celice (Saladin, 2009).

Embrionalne matične celice najdemo v zgodnjem zarodku. V zgodnjih fazah razvoja zarodka, so matične celice totipotentne, kar pomeni, da se lahko razvijejo v kateri koli tip telesnih celic hkrati pa lahko tvorijo tudi posteljico in plodove ovoje. Zaradi zmožnosti diferenciacije v kateri koli celični tip pravimo, da je njihova plastičnost neomejena. Štiri dni po oploditvi, pa razvijajoči se embrio vstopi v blastocistno fazo. Za celice notranje mase blastociste pravimo, da so pluripotentne, kar pomeni, da se lahko razvijejo v vse tipe telesnih celic, ne morejo pa tvoriti placente in plodovih ovojnici, zato je njihova plastičnost omejena (Saladin, 2009; Watt in Driskell, 2010).

Odrasle matične celice so v telesu v nizkem številu prisotne tekom celotnega življenja. Tipično se odrasle matične celice mitotsko delijo, pri čemer ena hčerinska celica obdrži lastnosti matične celice, druga celica pa se diferencira in prispeva k rasti organov in njihovi regeneraciji. Glede na sposobnost diferenciacije odrasle matične celice ločimo na multipotentne in unipotentne. Multipotentne celice so se sposobne diferencirati v dva ali več različnih celičnih tipov, unipotentne celice pa se lahko diferencirajo le v en celični tip, zato imajo te celice najmanjšo plastičnost (Saladin, 2009).

2.5.1 Terapije z uporabo matičnih celic

Številne raziskave kažejo, da imajo tako embrionalne kot odrasle matične celice velik potencial za uporabo v terapevtske namene. Odrasle matične celice pomagajo pri obnovi tkiva ob poškodbi in so zato ene ključnih akterjev pri regeneraciji tkiva. Odrasle matične celice so našli v skoraj vseh tkivih v telesu, njihova uporaba v regenerativni medicini pa je etično manj sporna kot uporaba embrionalnih matičnih celic (Cha in Falanga, 2007; Lau in sod., 2009). V zadnjih letih je veliko raziskav usmerjenih na področje induciranih pluripotentnih matičnih celic (iPC), ki kažejo podobne lastnosti kot embrionalne matične celice in niso etično sporne, ker za njihov razvoj niso potrebne celice zgodnjih zarodkov (Robinton in Daley, 2012).

Matične celice imajo vlogo pri vseh fazah zdravljenja rane. V prvi fazi celjenja olajšajo zaključek vnetne faze in prehod v naslednjo fazo zdravljenja rane in tako preprečujejo nastajanje kroničnih ran (Maxson in sod., 2012). Matične celice se lahko diferencirajo v

keratinocite, sodelujejo pa tudi pri angiogenezi, obnovi lasnih foliklov in repigmentaciji kože (Lau in sod., 2009).

Različni avtorji so pokazali, da neposredna aplikacija matičnih celic v rano pozitivno vpliva na hitrost zapiranja in zdravljenja rane, kar kaže na potencialno uporabo matičnih celic v terapevtske namene (Kim in sod., 2007; Leonardi in sod., 2012; Nakagawa in sod., 2005). Določene raziskave pa kažejo, da matične celice pozitivno vplivajo na celjenje ran tudi, če so dodane sistemsko (McFarlin in sod., 2006). Za namene terapije, bi matične celic v telo lahko vnesli z direktnim nanosom na površino rane, injicirali v rano ali pa uporabili nosilec, na katerega bi vezali matične celice (Lau in sod., 2009).

2.5.2 Izločeni dejavniki matičnih celic

Znano je, da matične celice vplivajo na zdravljenje kožnih ran preko dveh mehanizmov: diferenciacije matičnih celic v različne celične tipe in s sproščanjem različnih dejavnikov, ki parakrino delujejo na okoliško tkivo. Zaradi omejene diferenciacije in slabega preživetja matičnih celic na mestu rane predvidevajo, da prav parakrino delovanje matičnih celic pripomore k boljšemu celjenju ran (Hocking in Gibran, 2010; Maxson in sod., 2012). To potrjujejo raziskave različnih avtorjev, ki so pokazali, da na celjenje ran pozitivno vpliva ne le dodajanje matičnih celic na mesto rane, temveč tudi rastni dejavniki, ki jih matične celice izločajo (Chen in sod., 2008; Kim in sod., 2007; Lee in sod., 2009; Lee in sod., 2011). Ker se zdi uporaba medija, v katerem so rasle matične celice odlična rešitev za zdravljenje ran (Jayaraman in sod., 2013), se veliko trenutnih raziskav osredotoča na določitev sekretoma matičnih celic (Makridakis in sod., 2013). Analize kažejo, da matične celice izločajo vrsto rastnih dejavnikov, citokinov in kemokinov, ki ciljno delujejo na različne celične tipe v koži (Hocking in Gibran, 2010).

V mediju, v katerem so rasle matične celice, so identificirali visoke koncentracije različnih rastnih dejavnikov in citokinov, kot so EGF, eritropoetin, FGF, IGF-I, IL-6, IL-8, KGF, PDGF, TGF- β 1, trombopoetin in VEGF (Chen in sod., 2008; Kim in sod., 2007; Lee in sod., 2009; Lee in sod., 2011; Walter in sod., 2010). Omenjene molekule vplivajo na proliferacijo in migracijo makrofagov, endotelijskih celic, keratinocitov in fibroblastov *in vitro* (Hocking in Gibran, 2010; Maxson in sod., 2012).

Pokazali so, da dodajanje medija, v katerem so rasle matične celice, v primerjavi s kontrolo pospeši hitrost zapiranja raze v *in vitro* modelih celjenja ran. K večji hitrosti zapiranja rane naj bi prispevala tako proliferacija kot tudi migracija celic na mesto raze (Chen in sod., 2008; Kim in sod., 2007; Lee in sod., 2009; Lee in sod., 2011; Walter in sod., 2010). Kim in

sodelavci (2007) so pokazali, da je hitrost rasti celic odvisna tudi od koncentracije dodanega medija, saj so celice ob dodatku 50% medija, v katerem so rasle matične celice, rasle počasneje, kot v 100% mediju. Vsi avtorji so z uporabo medija, v katerem so rasle matične celice pokazali, da na zapiranje rane vplivajo dejavniki, ki jih izločajo matične celice. S tem so dokazali, da matične celice sproščajo topne dejavnike, ki parakrino vplivajo na migracijo in proliferacijo celic ter izboljšajo celjenje ran (Chen in sod., 2008; Kim in sod., 2007; Lee in sod., 2009; Lee in sod., 2011; Walter in sod., 2010).

Nadaljnje raziskave so pokazale, da dodajanje medija, v katerem so rasle matične celice, vpliva tudi na celjenje rane v pogojih *in vivo*. Dodajanje medija, v katerem so rasle matične celice, direktno na rano signifikantno izboljša celjenje rane v *in vivo* mišjih ali podganjih modelih (Chen in sod., 2008; Lee in sod., 2009; Lee in sod., 2011; Yew in sod., 2011).

Omenjene raziskave potrjujejo, da matične celice na celjenje ran vplivajo predvsem preko sproščanja različnih rastnih dejavnikov in citokinov. Zato se zdi terapevtska uporaba medija, v katerem so rasle matične celice odlična alternativa terapijam z matičnimi celicami (Jayaraman in sod., 2013).

2.5.3 Omejitve uporabe matičnih celic

Omejitve in tveganja pri uporabi matičnih celic za zdravljenje so odvisna od tipa matičnih celic, postopka pridobivanja in gojenja matičnih celic ter od mesta vnosa (Herberts in sod., 2011).

Najresnejši pomislek glede uporabe matičnih celic v terapevtske namene je njihova potencialna tumorogenost. Največje tveganje za razvoj tumorjev predstavljajo nediferencirane embrionalne matične celice, vendar lahko nastanek tumorjev sprožijo tudi tkivno specifične matične celice, kar vzbuja dodatne pomiske o varnosti terapij z matičnimi celicami (Gruen in Grabel, 2006; Mountford, 2008). Kot rešitev se ponuja sortiranje celic in uporaba diferenciranih celic, vendar bi lahko že ena sama celica, ki bi zaobšla selekcijo povzročila razvoj tumorja (Mountford, 2008).

Težavo pri terapevtski uporabi predstavlja tudi kontaminacija matičnih celic z živalskimi produkti. Matične celice običajno gojimo v kokulturi s celicami hrnilnega sloja, ki omogočajo preživetje in ohranjanje nediferenciranega stanja matičnih celic. Celice hrnilnega sloja so po izvoru običajno živalske celice, ki v gojišče izločajo živalske rastne dejavnike. Obenem gojišča za gojenje matičnih celic običajno vsebujejo komponente živalskega seruma, s čimer so matične celice še dodatno izpostavljene živalskim kontaminantam. Celice, ki jih

gojimo v prisotnosti takšnih kontaminant, lahko sprožijo imunski odziv v gostitelju, ali pa vsebujejo potencialne patogene (Gruen in Grabel, 2006; Herberts in sod., 2011; Mountford, 2008). Rešitev se ponuja v gojenju matičnih celic v gojišču brez seruma, gojišču s človeškim serumom ter gojenje na celicah hrnilnega sloja človeškega izvora ali brez njih (Gruen in Grabel, 2006).

Genetska kompatibilnost je še ena od omejitev uporabe matičnih celic v terapevtske namene. Matične celice morajo biti genetsko kompatibilne s prejemnikom, sicer pride do zavrnitve matičnih celic in do imunskega odgovora. Matične celice bi morale biti tako narejene za vsakega posameznega pacienta posebej iz njegovih lastnih celic, kar bi podražilo in podaljšalo terapijo (Gruen in Grabel, 2006).

Pri načrtovanju terapij je pomembno upoštevati tudi starost pacientov. S staranjem se namreč zmanjšuje funkcionalnost matičnih celic in zato uporaba avtolognih matičnih celic pri starostnikih ne bi imela želenega vpliva. (Lau in sod., 2009). Poleg težav z zavrnitvijo matičnih celic oviro predstavlja tudi pridobivanje matičnih celic v zadostnem številu za potrebe terapij. Dodatno oviro predstavlja slabo preživetje matičnih celic ob vnosu v gostitelja, kar še dodatno otežuje terapije z matičnimi celicami (Jayaraman in sod., 2013).

Zaradi mnogih omejitev uporabe matičnih celic, se zdi uporaba medija, v katerem so rasle matične celice, boljša izbira za terapevtske aplikacije, vendar pa imajo tudi takšne aplikacije svoje omejitve (Jayaraman in sod., 2013). Tudi v primeru medija, bi bilo potrebno omejiti živalske kontaminante, ki izvirajo iz načina gojenja matičnih celic. Zato bi morali za uporabo medija, v katerem so rasle matične celice, uporabiti človeške celice za hrnilno podlago ali pa matične celice gojiti v odsotnosti celic hrnilne podlage. Obenem, bi morali živalski serum nadomestiti s človeškim serumom, še boljša pa bi bila uporaba medija brez seruma. Za uporabo medija v katerem so rasle matične celice, bi morali matične celice gojiti v posebnih pogojih brez kontaminantov, kar bi podražilo pridobivanje in terapijo s takšnim medijem (Jayaraman in sod., 2013).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema

Preglednica 2: Laboratorijska oprema

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Applied Biosystems (ABI)	Naprava za verižno reakcijo s polimerazo
Binder	CO ₂ inkubator za celične kulture
Biometra	Kadička za agarozno gelsko elektroforezo Horizon® 1.4, transiluminator
BioRad	MiniProtean (sistem za poliakrilamidno gelsko elektroforezo), Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (sistem za mokri Western prenos), električni napajalnik
DNR Bio-Imaging Systems	Aparatura za fotografiranje agaroznih gelov
Eppendorf	Namizna centrifuga MiniSpin, termoblok Thermomixer comfort, avtomatske pipete (10 ml, 5 ml, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl in 2,5 µl), mikrocentrifugirke
Euromex	Invertni svetlobni mikroskop
Gilson	Avtomatske pipete (5 ml, 200 µl, 100 µl in 20 µl)
Hettich	Centrifuga Universal 320R
Ibidi	Mikroskopirne komore za celične kulture z 8 vdolbinicami
IKA	Magnetna mešala, vrtinčnik MS3 basic
inoLab	pH meter WTW series
Invitrogen	Naprava za avtomatizirano štetje celic Countessa, števne ploščice, barvilo tripan modro
Iskra PIO d.o.o.	Brezprašna komora M18
Kambič	Parni sterilizator A500/700, inkubator, stresalnik
Leica Microsystems	Leica TCS SP5 invertni konfokalni mikroskop in pripadajoči računalniški program Leica LAS AF Lite za obdelavo podatkov
Moulinex	Mikrovalovna pečica SYBIO
Sarstedt	Nastavki za pipete, mikrocentrifugirke in centrifugirke različnih volumnov
Sartorius Stedim Biotech	Tehtnica
Syngene	G:BOX in pripadajoči računalniški program za obdelavo podatkov
Thermo Scientific	NanoDrop 1000 in pripadajoči računalniški program za obdelavo podatkov
TPP	Posodice za gojenje celičnih kultur različnih velikosti, plošče za gojenje celičnih kultur, serološke pipete, centrifugirke

3.1.2 Kemikalije

Preglednica 3: Uporabljene kemikalije

Proizvajalec	Kemikalije
abcam	FGF basic Mouse ELISA Kit IGF1 Mouse ELISA Kit VEGF Mouse ELISA Kit
Applied Biosystems	High capacity cDNA Reverse Transcription Kit
ebioscience	Human/Mouse TGFB1beta 1 ELISA Ready-SET-Go!
Fermentas	DNA standard GeneRuler™ 1kbp DNA Ladder, GeneRuler 50bp DNA Ladder, 6x DNA nanašalni pufer, PageRuler Prestained Protein Ladder, restriktijski encimi (EcoRI, HindIII), restriktijski pufri
Gibco	FBS (Fetal Bovine Serum), DMEM+GlutaMAX™-I, DMEM/F-12, GlutaMAX™
IDT	Začetni oligonukleotidi
Merck	Bakteriološki agar, metanol, izopropanol, NaCl
New England Biolabs	DNA polimeraza Phusion, T4 ligaza, T4 ligazni pufer
Nippon Genetics	FastGene® Plasmid Mini Kits, FastGene® Gel/PCR Extraction Kits
Polysciences	Polietilenimid
Promega	RQ1 RNase-Free Dnaza, RQ1 Rnase-Free Dnazni 10X reakcijski pufer, RQ1 Dnase Stop Solution
R&D Systems	Mouse/Rat PDGFBB-BB Quantikine ELISA Kit
Roche	LightCycler® 480 SYBR Green I Master
Sigma Aldrich	Gojišče LB po Millerju, G418 sulfat, Etidijev bromid, ampicilin, dNTP, agarosa, tripsin-EDTA, DMSO, akrilamid, β-merkaptoetanol, metanol, TEMED, Tris
Roche	High Pure RNA Isolation Kit
Stratagene	I-Block
Thermo Scientific	SuperSignal West Femto Substrate Maximum Sensitivity Substrate, SuperSignal West Pico Substrate

3.1.3 Raztopine in pufri

Preglednica 4: Pufri in raztopine za delo z DNA

Raztopina / pufer	Sestava
1% agarozni gel	1g agaroze + 100 ml 1x TAE pufra
50 x TAE pufer za agarozno gelsko elektroforezo	2 M Tris, 5,71% (v/v) ledocetna kislina, 50 mM EDTA, pH 8,0
5x »hitri« ligacijski pufer	66 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 1 mM ATP, 6% PEG 6000, pH 7,6
6x nanašalni pufer za agarozno gelsko elektroforezo	0,25% bromfenolmodro, 0,25% ksilencianol, 40% glukoza
Raztopina dNTP za PCR	2,5 mM dATP, 2,5 mM dCTP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM dTTP v MQ

Preglednica 5: Pufri in raztopine uporabljeni za delo s celičnimi kulturami

Raztopina / pufer	Sestava
10 x PBS (fosfatni pufer)	1,7 M NaCl, 34 mM KCl, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Natrijev klorid za transfekcijo	150 mM NaCl
PEI transfekcijski reagent	7,5 M Polietilenimid (PEI)

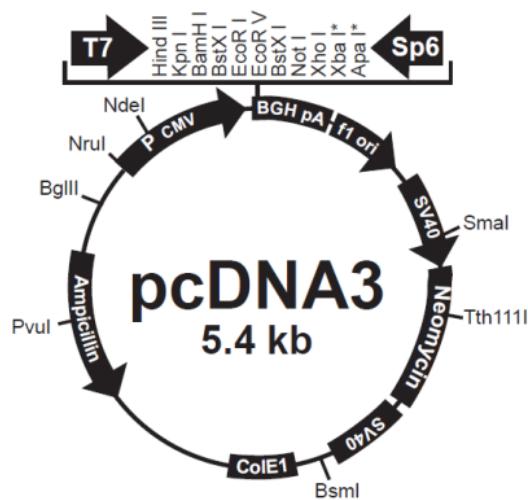
Preglednica 6: Pufri in raztopine za delo s proteini

Raztopina / pufer	Sestava
12 % ločitveni poliakrilamidni gel	3,05 ml MQ; 1,25 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8); 100 µl 10-odstotni SDS; 4,0 ml 30-odstotni akrilamid; 50 µl 10-odstotni APS; 5 µl TEMED
4 % vstopni poliakrilamidni gel	3,35 ml MQ; 4,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8); 50 µl 10-odstotni SDS; 0,665 ml 30-odstotni akrilamid; 25 µl 10-odstotni APS; 5 µl TEMED
10 x elektroforezni pufer za SDS-PAGE	0,250 M Tris; 1,92 M glicin; 1% SDS; pH 8,3
4 x nanašalni pufer za SDS-PAGE z reducentom	0,138 M SDS; 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8); 40% (v/v) glicerol; 10% (v/v) β-merkaptoetanol; 0,1% (w/v) bromfenol modro
Pufer za mokri prenos (Western prenos)	25 mM Tris; 192 mM glicin; 20% metanol; pH 8,3
Pufer za spiranje	1 x PBS; 0,01% Tween
Pufer za blokiranje	1 x PBS; 0,01% Tween; 0,2% iBlock
Pufer RIPA	50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% TRITON X-100; 0,1% SDS; 0,5% DOC

3.1.4 Plazmidi

3.1.4.1 pcDNA3.0

pcDNA3.0 vektor se uporablja za izražanje proteinov v sesalskih celicah. Plazmid vsebuje močan človeški konstitutivni promotor iz citomegalovirusa (CMV). Za njem se nahaja območje z več mesti za kloniranje. Plazmid nosi zapis za odpornost proti ampicilinu in neomicinu, kar omogoča selekcijo transficiranih celic. Na plazmidu se nahaja tudi SV40 ORI mesto začetka podvojevanja. To mesto omogoča podvojevanje plazmida v celicah, ki izražajo veliki SV40 antigen T.



Slika 11: Shematski prikaz plazmida pcDNA3 (Invitrogen)

3.1.5 Geni

Preglednica 7: Uporabljeni geni

Proizvajalec	Gen (cDNA)	Plazmid	Identifikacijska številka NCBI
Sino Biological Inc.	<i>Egfl7</i>	pMD18-T Simple	NM_178444.3
Sino Biological Inc.	<i>Fgf2</i>	pMD18-T Simple	NM_008006.2
Sino Biological Inc.	<i>Igf1</i>	pMD18-T Simple	NM_010512.4
Sino Biological Inc.	<i>Pdgfb</i>	pGEM-T	NM_011057.3
Sino Biological Inc.	<i>Tgfb1</i>	pMD19-T	NM_011577.1
Sino Biological Inc.	<i>Vegfa</i>	pMD18-T Simple	NM_001025257.3

3.1.6 Restriktivni encimi

Preglednica 8: Uporabljeni restriktivni encimi

Restriktivni encim	Prepoznavno mesto	Proizvajalec
EcoRI	G↓AATTC	Fermentas
HindIII	A↓AGCTT	Fermentas

3.1.7 Začetni oligonukleotidi

Preglednica 9: Preglednica začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje rastnih dejavnikov z metodo verižne reakcije s polimerazo

Ime	Oznake začetnih oligonukleotidov	Oligonukleotidno zaporedje 5' → 3'
LK_HindIII_mbFGF-f	4377	CGAGAACGTTGCCACCATGGCTGCCAGCGGCATCAC
LK_EcoRI_mbFGF-r	4378	CGTCGAATTCTCAGCTCTTAGCAGACATTGGAAGAA ACAG
LK_HindIII_mIGF1-f	4379	CGAGAACGTTGCCACCATGGGAAAATCAGCAGCCT
LK_EcoRI_mIGF1-r	4380	CGTCGAATTCTACTTGTGTTCTCAAATGTACTTCCT TTC
LK_HindIII_mPDGFBB-B-f	4381	CGAGAACGTTGCCACCATGAATCGCTGCTGGC
LK_EcoRI_mPDGFBB-B-r	4382	CGTCGAATTCTAGGCTCCGAGGGTCTC
LK_HindIII_mTGF-B1-f	4383	CGAGAACGTTGCCACCATGCCGCCCTCGGGGCT
LK_EcoRI_mTGF-B1-r	4384	CGTCGAATTCTCAGCTGCACTTGCAAGGAGC
LK_HindIII_mVEGF-A-f	4385	CGAGAACGTTGCCACCATGAACTTCTGCTCTTTGG GTG
LK_EcoRI_mVEGF-A-r	4386	CGTCGAATTCTCACCGCCTTGGCTTGTC
LK_HindIII_mEGL7-f	4387	CGAGAACGTTGCCACCATGCCCTGGGGCGAAGG
LK_EcoRI_mEGL7-r	4388	CGTCGAATTCTACTGAACTGGCTCTGTCTGCCG
LK_HindIII_mEGL7-f	4389	CGAGAACGTTGCCACCATGTGGGGCTCCGGAGAAC
LK_EcoRI_mEGL7-r	4390	CGTCGAATTCTACAGATCTTTGCAGGAGCAGGA C

Preglednica 10: Preglednica začetnih oligonukleotidov za kvantitativno metodo verižne reakcije s polimerazo

Ime	Oznake začetnih oligonukleotidov	Zaporedje 5' → 3'
LK_Fgf2_RTp1_f	4540	AGCGGCTCTACTGCAAGAAC
LK_Fgf2_RTp1_r	4541	TGGCACACACTCCCTTGAT
LK_Fgf2_RTp2_f	4542	AGTGTGTGCTAACCGTTACCT
LK_Fgf2_RTp2_r	4543	ACTGCCAGTCGTTAGTG
LK_Igf1_RTp1_f	4544	AGCTGGACCAGAGACCCTTT
LK_Igf1_RTp1_r	4545	GCAACACTCATCCACAATGC
LK_Igf1_RTp2_f	4546	CTGGACCAGAGACCCTTTGC
LK_Igf1_RTp2_r	4547	GGACGGGACTTCTGAGTCTT
LK_Pdgfb_RTp1_f	4548	CTCGATCCGCTCCTTGATGA
LK_Pdgfb_RTp1_r	4549	CGTTGGTGCAGTCTATGAG
LK_Pdgfb_RTp2_f	4550	AAGTGTGAGACAATAGTGACCCC
LK_Pdgfb_RTp2_r	4551	CATGGGTGTGCTTAAACTTCG
LK_TgfB1_RTp1_f	4552	GGAGAGCCCTGGATACCAAC
LK_TgfB1_RTp1_r	4553	AAGTTGGCATGGTAGCCCTT
LK_TgfB1_RTp2_f	4554	CTTCAATACTGTCAGACATTGGG
LK_TgfB1_RTp2_r	4555	GTAACGCCAGGAATTGTTGCTA
LK_Egfl7_RTp1_f	4556	AGCACCTACCGAACCATCTAC
LK_Egfl7_RTp1_r	4557	TGTCTGGCAAGTATCTCCCTG
LK_Egfl7_RTp2_f	4558	CGCTGTGTCATACTGTGGGA
LK_Egfl7_RTp2_r	4559	GTTCTAGCACATCAACCCGAG
LK_Vegfa_RTp1_f	4560	CGATTGAGACCCTGGTGGAC
LK_Vegfa_RTp1_r	4561	GCTGGCTTGGTGAGGTTG
LK_Vegfa_RTp2_f	4562	CCACGACAGAAGGGAGAGCAG
LK_Vegfa_RTp2_r	4563	CACTCCAGGGCTTCATCGTT
HPRT1_f	1365	AGATGGTCAAGGTGCAAG
HPRT1_r	1366	TTCATTATAGTCAAGGGCATATCC

3.1.8 Protitelesa

Preglednica 11: Uporabljena protitelesa

Protitel	Proizvajalec	Opis
EGFL7 (M-135)	Santa Cruz Biotechnology	Zajčja poliklonska protitelesa proti mišemu EGFL7
Sekundarna protitelesa	abcam	Kozja protitelesa proti zajčjim poliklonskim protitelesom konjugirana s hrenovo peroksidazo

3.1.9 Gojišča

3.1.9.1 Bakterijska gojišča

Bakterije E. coli smo gojili na trdnih in tekočih LB gojiščih po Millerju

Preglednica 12: Gojišča za gojenje bakterij

Gojišče	Sestava
Tekoče LB gojišče po Millerju	25 g/L
Trdno LB gojišče po Millerju	25 g/l 15 g/l agar
	50 µg/ml ampicilin

3.1.9.2 Gojišča za gojenje celičnih kultur

HEK293T celice smo gojili v gojišču DMEM z 10% FBS.

NIH3T3 celice smo gojili v gojišču DMEM/F-12, GlutaMAX™ s 5% FBS.

3.1.10 Organizmi

3.1.10.1 Bakterijske kulture

Preglednica 13: Bakterijske kulture

Sev	Genotip	Vir
E.coli DH5α	F/ <i>sup</i> E44, Δ lacU169 (Φ 80 lacZΔM15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1,</i> <i>relA1</i>	Zbirka sevov Kemijskega inštituta
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Zbirka sevov Kemijskega inštituta

3.1.10.2 Celične kulture

Preglednica 14: Celične kulture

Celična kultura	Opis	Vir
HEK293T	trajna celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic z vstavljenim velikim T-antigenom virusa SV40	Carsten Kirschning (Tehniška Univerza München)
NIH3T3	Trajna celična kultura fibroblastov, ki izvira iz mišjih zarodkov	CLS, Cell Lines Service

3.2 METODE

3.2.1 Sterilizacija gojišč in materialov

Ves material in pripomočke za delo z bakterijskimi in celičnimi kulturami smo pred začetkom dela sterilizirali s postopkom sterilizacije z vlažno topoto (avtoklavirali). Sterilizacija je potekala pri standardnih pogojih: 20 min, 121°C in 1,2 bar. Termolabilne snovi smo sterilizirali s filtracijo preko filtra s premerom por 0,2 µm.

3.2.2 Priprava gojišč

Za gojenje bakterij *E.coli*, smo uporabili Luria-Bertani (LB) gojišče. Za selekcijo uspešno transformiranih bakterij smo uporabili antibiotik ampicilin.

Za pripravo tekočega gojišča LB smo primerno količino gojišča raztopili v destilirani vodi in ga sterilizirali. Pred inokulacijo smo v gojišče dodali antibiotik ampicilin v končni koncentraciji 50 µg/mL. Inokulirano gojišče smo inkubirali na 37°C ter 150 vrt./min 16 ur.

3.2.3 Molekularne metode

3.2.3.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR reakcijo smo izvedli z uporabo DNA polimeraze Accuprime. Za matrice smo uporabili plazmide, ki so vsebovali cDNA rastnih dejavnikov (SinoBiological). Sestava reakcijskih mešanic in temperaturni profil sta prikazana v preglednici 15 in 16.

Preglednica 15: Sestava reakcijske mešanice za PCR reakcijo

	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen [µL]
Matrična DNA	20 ng/µl	0,4 ng/µl	1
DNA polimeraza Phusion® High-Fidelity	2,5 U/µl	0,05 U/µl	1
5x Phusion reakcijski pufer	5 x	1 x	10
dNTP	10 mM	0,2 mM	1
Začetni oligonukleotid – vodilni	20 pmol/µl	0,4 pmol/µl	0,5
Začetni oligonukleotid – povratni	20 pmol/µl	0,4 pmol/µl	0,5
MQ			36
Končni volumen			50

Preglednica 16: Temperaturni profil PCR reakcije

Stopnja		Temperatura	Čas	Število ciklov
1	Začetna denaturacija	98 °C	1 min	1
2	Denaturacija	98 °C	15 s	30
	Naleganje	$T_m + 3^\circ\text{C}$	30 s	
	Podaljševanje	72 °C	20 s / 1Kb	
3	Končno podaljševanje	72 °C	5 min	1
4	Konec reakcije	10 °C	∞	

3.2.3.2 Agarozna gelska elektroforeza

Uspešnost pomnoževanja fragmentov s PCR smo ocenili z agarozno gelsko elektroforezo. Za ločevanje fragmentov smo uporabili 1% gel (m/v). Gel smo pripravili tako, da smo najprej zatehtali primerno maso agaroze (1 g), ki smo jo s segrevanjem v mikrovalovni pečici raztopili v 100 ml 1X pufra TAE. Ko se je mešanica ohladila, smo vanjo dodali 2 µl etidijevega bromida s koncentracijo 10 g/l, jo vlili v pripravljen kalup in počakali, da se je gel strdil. Pred nanosom na gel smo vzorcem dodali primeren volumen šestkratnega nanašalnega pufra, da je v končni zmesi predstavljal 1/6 celotnega volumna zmesi. Elektroforeza je tekla pri stalni napetosti 100 V. Po končani elektroforezi smo gel presvetlili z UV svetlobo in ga fotografirali.

3.2.3.3 Čiščenje fragmentov DNA iz gela

Fragmente ustreznih dolžin smo izrezali iz agaroznega gela in jih po navodilih proizvajalca očistili z uporabo komercialnega kompleta FastGene® Gel/PCR Extraction Kits (Nippon Genetics). Čiščenje DNA temelji na raztopljanju agaroznega gela in selektivni adsorbciji DNA na membrano. DNA smo iz kolone eluirali v 50 µl MQ.

3.2.3.4 Merjenje koncentracije DNA

Za merjenje koncentracije DNA, smo uporabili spektrofotometer NanoDrop, ki iz vrednosti absorbance pri 260 nm preračuna koncentracijo DNA v našem vzorcu. Izračun temelji na Beer–Lambertovem zakonu in na približku, osnovanem na meritvah, da ima vzorec dvojerižne DNA s koncentracijo 50 µg/ml pri 260 nm absorbanco 1.

3.2.3.5 Restrikcija z endonukleazami

Encimi restriktijske endonukleaze prepoznavajo kratka DNA zaporedja in cepijo dvojerižno DNA na specifičnih mestih, ki jih prepozna. Za restrikcijo PCR fragmentov in plazmidnega vektorja smo uporabili restriktijska encima *Hind*III in *Eco*RI (preglednica 8). Količine in reagenti so podani v preglednici 17. Reakcijske mešanice smo inkubirali 3 ure na 37 °C.

Preglednica 17: Sestava reakcijske mešanice za restrikcijo

	Končna koncentracija	Volumen [μl]
Plazmidna DNA	3 μg	
HindIII	10 U/μl	1,5 μl
EcoRI	10 U/μl	1,5 μl
10 x pufer NEB 2	1 x	5 μl
MQ		do 50 μl

3.2.3.6 Čiščenje restriktijskih produktov

Po končani restrikciji smo produkte PCR očistili z uporabo komercialnega paketa FastGene® Gel/PCR Extraction Kits (Nippon Genetics) po navodilih proizvajalca. Rezan plazmid smo nanesli na agarozni gel in ga po končani elektroforezi izolirali iz gela.

3.2.3.7 Ligacija

Za ligacijo izbranih DNA fragmentov in plazmida smo uporabili postopek hitre ligacije s T4-DNA-ligazo. Za uspešno ligacijo smo fragment in plazmid zmešali v molarnem razmerju insert : vektor = 3:1. Količine smo izračunali po enačbi 1:

$$\text{masa fragment} = \frac{\text{masa vektor} * \text{dolžina (fragment)}}{\text{dolžina (vektor)}} * 3 \quad \dots(1)$$

Ligacijska mešanica je vsebovala izbrano količino plazmidnega vektorja, preračunano količino inserta, 4 μL 5x hitrega ligaznega pufra, 1 μL T4-DNA-ligaze (400 U/ μl) in MQ do končnega volumna 20 μl. Ligacijsko mešanico smo inkubirali 20 minut na sobni temperaturi, ob zaključku ligacije pa smo dodali MQ do končnega volumna 50 μl.

3.2.3.8 Transformacija kompetentnih celic

Kompetentne celice, ki jih hranimo na – 80 °C smo odmrznili na ledu. Po približno pol ure smo jim dodali 25 μl ligacijske mešanice, ter jih 30 minut inkubirali na ledu. Nato smo izvedli toplotni šok, pri katerem smo celice za 2 minuti prenesli na 42 °C, nato pa za 2 minuti na led. Celicam smo dodali 1 ml gojišča in jih inkubirali eno uro na 37 °C, 500 vrt./min. Po končani inkubaciji smo celice centrifugirali 3 minute pri 7000 vrt./min in odstranili supernatant.

Celični pelet smo resuspendirali v 50 μl tekočega LB gojišča. Celično suspenzijo smo razmazali na trdo gojišče LB z dodanim ampicilinom. Plošče smo inkubirali na 37°C preko noči.

3.2.3.9 Izolacija plazmidne DNA

Za izolacijo plazmidne DNA smo uporabili komercialni komplet »FastGene® Plasmid Mini Kit« (Nippon Genetics) in izolacijo izvedli po navodilih proizvajalca. Postopek izolacije plazmidne DNA temelji na alkalni lizi celic in adsorbciji plazmidne DNA na membrano kolone. Plazmidno DNA smo iz kolone eluirali v 100 µl sterilne MQ in izmerili koncentracijo z napravo NanoDrop.

3.2.3.10 Določitev nukleotidnega zaporedja

Po potrditvi primernih dolžin produktov PCR z uporabo kontrolne restrikcije smo naše plazmide poslali na sekveniranje. Za sekveniranje smo zmešali 1,25 µl začetnega oligonukleotida, 400 – 600 ng plazmidne DNA in dodali MQ do končnega volumena 10 µl ter poslali na sekveniranje (GATC Biotech).

3.2.3.11 Priprava trajnih kultur

Za daljše hranjenje plazmidov, katerih zaporedje smo potrdili s sekveniranjem, smo pripravili trajne kulture celic *E. coli* TOP10. Za pripravo trajnih linij smo 1 ml sveže bakterijske kulture, transformirane z želenim plazmidom, zmešali z 1 ml 50% glicerola (v/v). Celice v glicerolu smo shranili na -80 °C.

3.2.4 Gojenje celičnih kultur

Celične kulture HEK293T in NIH3T3 smo gojili v inkubatorju na 37°C in 5% CO₂. Omenjene celične kulture rastejo v monosloju, zato smo za njihovo gojenje uporabili primerne gojitvene posodice. Celice HEK293T smo gojili v mediju DMEM z 10 % FBS, celice NIH3T3 pa smo gojili v gojišču DMEM/F-12 s 5% FBS. Uporabljeni gojišča so vsebovala vsa potrebna hranila in rastne dejavnike za rast celic. Gojišče smo menjavali vsake 3 do 4 dni.

3.2.4.1 Odmrzovanje celic

Iz zbirke sesalskih celičnih kultur, ki so hranjene v parah tekočega dušika, smo vzeli vialo z željeno celično kulturo in jo čim hitreje odtalili. Odtaljene celice smo prenesli v centrifugirko z 9 ml primernega svežega gojišča in jih nežno premešali. Celice smo centrifugirali 5 minut na 1200 vrt./min na sobni temperaturi. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant, celice resuspendirali v primerenem svežem gojišču in jih prenesli v gojitveno posodico.

3.2.4.2 Zamrzovanje celic

Celicam v gojitveni posodici smo odstranili medij in jih sprali z 10 ml PBS. Nato smo dodali 2 ml tripsina z EDTA, ki je povzročil, da so se celic odlepile od podlage. Po nekaj minutah smo nevtralizirali encim z dodatkom 10 ml primernega gojišča. Celice smo skupaj z gojiščem prenesli v 15 ml centrifugirko in centrifugirali 5 minut na 1200 vrt./min. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in celice resuspendirali v hladnem FBS z dodanim DMSO (90 % FBS, 10 % DMSO) ter 1,5 ml suspenzije prenesli v krio-viale. Krio-viale smo zavili v vato in jih postavili na -80 °C za 24 ur, nato pa smo jih prenesli v posodo s temperaturo ~ -190 °C (pare N₂).

3.2.4.3 Redčenje celic

Uporabljene celice rastejo v monosloju, zato v določenem času prerastejo dno gojitvene posodice. Ko so celice dosegle visoko gostoto v gojitvenih posodicah, smo jih presadili oziroma zredčili. Celicam smo najprej odstranili izrabljeno gojišče in jih sprali z 10 ml PBS pufra. Nato smo dodali 2 ml tripsina z EDTA, ki je povzročil, da so se celice odlepile od podlage. Encim smo nevtralizirali z dodatkom 10 ml gojišča. Celice smo skupaj z gojiščem prenesli v 15 ml centrifugirko in centrifugirali 5 minut na 1200 vrt./min. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in celice nežno resuspendirali v 10 ml primernega medija. Del celic (najmanj 10%) smo vrnili v gojitveno posodico in dodali primerni gojitveni medij do končnega volumna 10 ml. Preostanek celic smo zavrgli ali pa uporabili v eksperimentih.

3.2.4.4 Nasaditev celic za eksperimente

Po enakem postopku kot za redčenje celic, smo pridobili 10 ml celične suspenzije v svežem gojišču. Majhen vzorec celic smo pobarvali z barvilom tripan modro in jih prešteli z uporabo avtomatiziranega števca celic Countessa. Nato smo preračunali volumen celic, ki jih moramo nasaditi na ploščo in dodali svež medij do končnega primerenga volumna. Nacepljene plošče smo inkubirali v inkubatorju na 37°C in 5% CO₂ preko noči.

Preglednica 18: Preglednica števila celic in volumna gojišča potrebnega za nasaditev celic

Tip plošče	Število celic v vdolbinici	Volumen gojišča v vdolbinici [ml]
24 vdolbinic	$1 \cdot 10^5$	0,5
6 vdolbinic	$4 \cdot 10^5$	2
10 cm	$4 \cdot 10^6$	10
Mikroskopska ploščica (8 vdolbinic)	$1 \cdot 10^5$	0,25

3.2.5 Transfekcija celičnih kultur

3.2.5.1 Prehodna transfekcija

Celično linijo HEK293T oz. NIH3T3 smo transficirali s plazmidi, ki nosijo zapis za različne rastne dejavnike (EGFL7, FGF-2, IGF-I, PDGF-B, TGF-β1 in VEGF-A). Posamezne celice smo transficirali le z enim dejavnikom. Za transfekcijo smo uporabili transfekcijski reagent PEI.

Dan pred transfekcijo smo nacepili primerno koncentracijo celic v plošče z vdolbinicami. Na dan transfekcije smo plazmidni DNA dodali 150 mM NaCl do želenega volumna. Ravno tako smo reagentu PEI dodali 150 mM NaCl do želenega končnega volumna. Nato smo združili mešanici DNA in transfekcijskega reagenta PEI in inkubirali 20 minut na sobni temperaturi, da so nastali transfekcijski kompleksi. Transfekcijsko mešanico smo dodali celicam in jih postavili v inkubator na 37°C in 5% CO₂ za tri dni.

Preglednica 19: Preglednica reakcijskih volumnov in količine DNA za transfekcijo

Plošča	DNA [µg]	DNA + NaCl [µl]	PEI [µl]	PEI + NaCl [µl]	Končni volumen [µl]
24 vdolbinic	0,75	50	9	50	100
6 vdolbinic	1,7	100	20,4	100	200
10 cm	5	250	60	250	500

3.2.5.2 Stabilna transfekcija

Celično linijo NIH3T3 nasajeno v 10 cm gojitveno posodico, smo transficirali s plazmidi, ki nosijo zapise za različne rastne dejavnike (EGFL7, FGF-2, IGF-I, PDGF-B, TGF- β 1 in VEGF-A). Posamezne celice smo transficirali le z enim dejavnikom in transfekcijo izvedli z reagentom PEI po enakem postopku kot za prehodno transfekcijo. Transficirane celice smo dan po transfekciji tripsinizirali in jih nasadili na dve 10 cm plošči. V prvo ploščo smo dodali antibiotik G418 v koncentraciji 0,6 g/l, v drugo ploščo pa smo dodali G418 v koncentraciji 1,2 g/l. Celice smo gojili v prisotnosti antibiotika tri tedne.

3.2.6 Pridobivanje rastnih dejavnikov

Uporabljeni rastni dejavniki so sekrecijski proteini, zato smo sklepali, da se bodo nahajali v mediju, v katerem so rasle transficirane celice. Transficiranim celicam smo dan po transfekciji zamenjali medij. Po 24 urah smo nato odvzeli medij in alikvote shranili na -80 °C.

3.2.7 Vrednotenje transkripcije rastnih dejavnikov v transficiranih celicah

3.2.7.1 Izolacija mRNA

mRNA smo izolirali iz transficiranih celic 48 ur po transfekciji. Za izolacijo smo uporabili komercialni paket High Pure RNA Isolation Kit (Roche) in izolacijo izvedli po navodilih proizvajalca.

3.2.7.2 Čiščenje izolirane mRNA

Za nadaljnje analize je potrebno, da razgradimo vso DNA, ki bi lahko bila prisotna v izoliranem vzorcu. Za razgradnjo DNA smo vzorcu dodali encim DNaza skupaj s primernim pufrom. Reakcijska mešanica je prikazana v preglednici 20:

Preglednica 20: Sestava reakcijske mešanice za razgradnjo DNA

Komponenta	Končna koncentracija/masa	Volumen [μl]
mRNA	1 μg	
RQ1 10X DNazni reakcijski pufer	1x	1
RQ1 RNase-Free DNaza	1U/μg RNA	1
MQ brez nukleaz		do 10

Reakcijsko mešanico smo inkubirali 30 minut na 37 °C. Po končani inkubaciji smo dodali 1 μl pufra za zaustavitev reakcije in inkubirali 10 minut na 65 °C.

3.2.7.3 Reverzna transkripcija

Za reverzno transkripcijo smo uporabili komplet High capacity cDNA Reverse Transcription Kit in postopek izvedli po navodilih proizvajalca.

Reakcijska mešanica je prikazana v preglednici 21, temperaturni profil pa v preglednici 22:

Preglednica 21: Reakcijska mešanica za reverzno transkripcijo

Komponenta	Koncentracija/masa	Volumen [μl]
10 x Pufer za reverzno transkriptazo	1 x	2
25× dNTP Mix (100 mM)	1 x	0,8
Začetni oligonukleotid - povratni* (100 μM založna)	0,2 μM	0,04
MultiScribe™ Reverzna transkriptaza (50 U/μl)	2,5 U/ μl	1
vzorec	1 μg	10
MQ		do 10
Končni volumen		20

*reakcijska mešanica je enaka za vse vzorce, saj v mešanico dodamo vse povratne začetne oligonukleotide hkrati

Preglednica 22: Temperaturni profil reverzne transkripcije

Stopnja	Temperatura	Čas [min]
1	25 °C	10
2	37 °C	120
3	85 °C	5
4	10 °C	∞

3.2.7.4 Kvantitativni PCR

Celotemu vzorec cDNA (20 μl) smo dodali 180 μl MQ, da smo dobili primerno koncentracijo za nadaljnjo analizo. Vzorcem smo pred reakcijo dodali ustrezne začetne oligonukleotide in reagent SYBR Green. Sestava reakcijske mešanice za kvantitativni PCR je prikazana v preglednici 23, temperaturni profil pa je prikazan v preglednici 24:

Preglednica 23: Sestava reakcijske mešanice za kvantitativni PCR

Komponenta	Koncentracija/masa	Volumen [μl]
Vzorec		5 μl
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	½	10 μl
250 x redčen forward primer	0,4 μM	0,08
250 x redčen reverse primer	0,4 μM	0,08
MQ		4,84
Končni volumen		20

Preglednica 24: Temperaturni profil reakcije PCR v realnem času

Stopnja		Temperatura °C	Čas	Število ciklov
1	Začetno segrevanje	95	15 min	1
2	Denaturacija	94	15 s	
3	Naleganje	60	30 s	45
4	Podaljševanje	72	30 s	
5	Končno podaljševanje	76	10 s	1

Faktor povečanja ekspresije transficiranih genov smo izračunali z uporabo primerjalne metode C_t ($2^{\Delta\Delta C_t}$), dobljene pomnožke pa nanesli na agarozni gel.

3.2.8 Proteini

3.2.8.1 Encimskoimunski test (ELISA)

Za določitev koncentracije proteinov v gojišču, v katerem so rasle transficirane celice, smo uporabili komercialno dostopne encimskoimunske teste. Teste smo izvedli po navodilih proizvajalcev. Kot vzorce smo uporabili gojišče, v katerem so rasle prehodno transficirane celice HEK293T ali stabilno transficirane celice NIH3T3. Vzorce gojišča smo pred nanosom redčili (1:10; 1:100; 1:1000 in 1:10000), da smo prišli v območje umeritvene krivulje. Dobljene vrednosti smo analizirali z uporabo internetnega programa Readerfit.

3.2.8.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE)

Pripravili smo gel za poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata. Najprej smo med stekelci, ločeni za širino 1 mm, vlili 12% ločitveni gel (preglednica 25), ga prelimili z izopropanolom in pustili polimerizirati. Ko se je ločitveni gel strdil, smo odstranili izopropanol in čez ločitveni gel vlili 4% vstopni gel (preglednica 25), v katerega smo vstavili glavniček ter ga pustili polimerizirati. Gel smo nato uporabili ali shranili na 4°C.

Preglednica 25: Sestava ločitvenega in vstopnega gela za poliakrilamidno gelsko elektroforezo

Komponenta	Volumen
LOČITVENI GEL	
MQ	3,35 ml
1,5 M Tris-HCl; pH 8,8	2,5 ml
10% (w/v) SDS	100 µl
Akrylamid/bis 30% stok	4 ml
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl
VSTOPNI GEL	
MQ	3,05 ml
1,5 M Tris-HCl; pH 6,8	1,25 ml
10% (w/v) SDS	50 µl
Akrylamid/bis 30% stok	665 µl
10% APS	25 µl
TEMED	5 µl

Kot vzorce smo uporabili celične lizate. Za pripravo celičnih lizatov smo celice najprej resuspendirali v pufru PBS in jih centrifugirali. Peletu smo dodali 150 µl pufra RIPA z dodanimi proteaznimi inhibitorji, resuspendirali celice in jih postavili na led za 30 min. Po končani inkubaciji na ledu smo vzorce centrifugirali 30 min na 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo supernatant nanesli na gel ali shranili na -20 °C. Pred nanosom na gel

smo izmerili koncentracijo proteinov s testom BCA (ang. bicinchoninic acid assay), ki temelji na nastanku obarvanega produkta ob prisotnosti peptidnih vezi. S pomočjo umeritvene krivulje, smo določili koncentracijo proteinov v vzorcih. Na gel smo nanesli 30 µg celokupnih proteinov, ki smo jim dodali SDS z reducentom (20 µl vzorca smo dodali 6,5 µl 4x SDS z reducentom).

Na gel smo nanesli 20 µl vzorca in 10 µl proteinskega standarda. Elektroforeza je potekala v 1x elektroforznem pufru, pri konstantni napetosti 200 V 40 minut.

3.2.8.3 Western prenos

Po končani elektroforezi smo ločitveni gel uporabili za western prenos. Pripravili smo kaseto za mokri western prenos, pri čemer smo morali biti pozorni na orientacijo membrane in gela glede na elektrode. V kaseto smo najprej dali omočene gobice, nato omočen filter papir ter nanje položili ločitveni gel. Čez ločitveni gel smo položili omočeno membrano, čeznjo pa ponovno filter papir in omočeno gobico. Tako sestavljenou kaseto smo prenesli v banjico za western prenos, kjer smo kaseto obrnili tako, da je bila stran z gelom orientirana proti negativni elektrodi, stran z membrano pa proti pozitivni elektrodi. Prenos je potekal 1 uro pri konstantnem toku 350 mA.

3.2.8.4 Imunodetekcija proteinov po western prenosu

Za blokado prostih vezavnih mest, smo membrano inkubirali 1 uro v raztopini iBlock (2 g/l v PBS-T). Po končanem blokiraju smo membrano sprali v pufru PBS-T (4 x 5 min). Na sprano membrano smo dodali primarna zajčja protitelesa proti EGFL7 redčena 1:100 v raztopini iBlock. Membrano smo inkubirali na stresalniku 1,5 ure na sobni temperaturi ali čez noč na 4 °C. Po končani inkubaciji smo sprali nevezana protitelesa s pufrom PBS-T (4 x 5 min) in dodali sekundarna kozja protitelesa proti zajčjim IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo, ki smo jih redčili 1:3000 v raztopini iBlock. Membrano smo inkubirali na stresalniku 1,5 ure na sobni temperaturi ali čez noč na 4 °C. Po končani inkubaciji smo membrano sprali v pufru PBS-T. Za detekcijo proteinov smo membrano prelimi z reagentom Pico ali Femto, in jo slikali z G:BOX sistemom.

3.2.9 Model za celjenje rane

Za oceno hitrosti rasti in migracije celic NIH3T3 v pogojih *in vitro* smo izvedli test hitrosti zapiranja raze, ki je enostavna in poceni metoda, ki se uporablja za študije migracije različnih celic.

Celice NIH3T3 smo nasadili v mikroskopske ploščice z 8 vdolbinicami v 200 µl medija. Na mikroskopske ploščice smo že pred nacepitvijo celic s skalpelom vrezali ravne črte, ki so nam

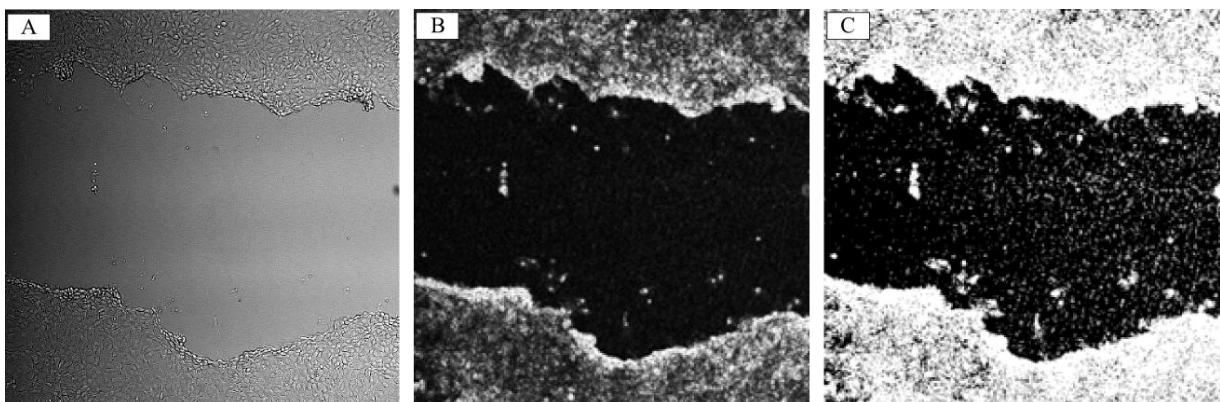
služile za orientacijo pri slikanju z mikroskopom. Ko so celice dosegle 100% konfluenco, smo vanje naredili razo z uporabo 200 µl pipetnih nastavkov. Odstranili smo gojišče in celicam dodali gojišče z dodanimi rastnimi dejavniki. Raze smo slikali ob času 0 in po 24 urah.

3.2.10 Mikroskopija

Za spremljanje hitrosti zapiranja raz smo uporabljali invertni konfokalni mikroskop Leica TCS SP5 in pripadajoči računalniški program Leica LAS AF Lite za obdelavo podatkov. Celice smo opazovali pri 10 x povečavi.

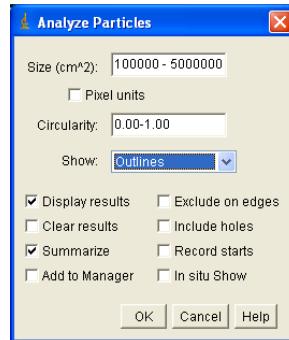
3.2.11 Analiza slik

Mikroskopske slike smo uredili in kvantificirali z uporabo programa ImageJ. Sliko raze (slika 12 A) smo najprej izostrili in označili robove s funkcijo Find Edges (slika 12 B). Nato smo prilagodili barve na sliki (spremenili »treashold«), da smo dobili jasno mejo med celicami in razo (slika 12 C).



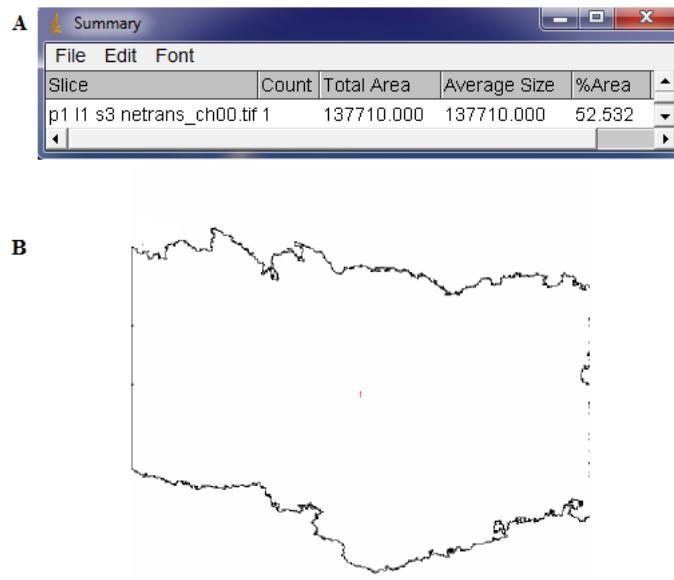
Slika 12: Analiza slike raze za kvantifikacijo A) slika raze pred obdelavo B) izostrena slika z označenimi robovi C) slika s prilagojeno barvo za jasno ločevanje raze od celic.

S funkcijo za analizo slik smo določili velikost delcev za analizo (1×10^5 - 5×10^7) in izbrali opcijo »outline« za grafični prikaz območja rane, ki ga je analiziral program (slika 13).



Slika 13: Nastavitev programa ImageJ za analizo delcev na sliki

Program nam je kot rezultat podal odstotek celotne slike, ki jo je predstavljal raza (slika 14 A) in obris raze (slika 14 B).



Slika 14: Rezultat analize raz s programom ImageJ A) kvantifikacija območja, ki ga predstavlja raza podano v odstotkih B) obris raze

Dobljene podatke smo statistično ovrednotili. Za statistično analizo smo uporabili Studentov *t*-test, kjer smo preizkušali domnevo o razlikah povprečji v primeru različnih varianc (ang. »*t*-test: Two sample assuming unequal variances«) in upoštevali dvostransko alternativno domnevo pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$.

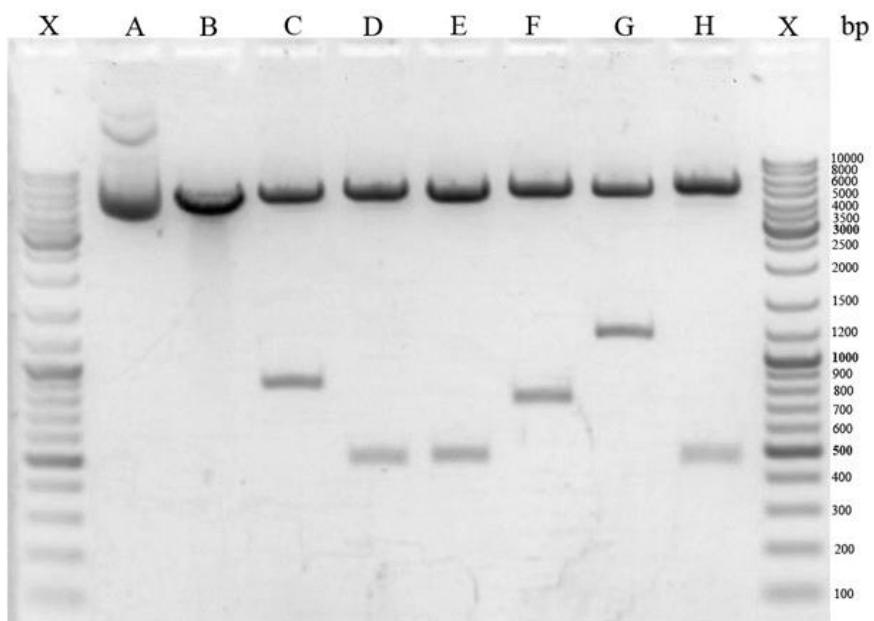
4 REZULTATI

4.1 IZBIRA RASTNIH DEJAVNIKOV

S pomočjo trenutno dostopne literature smo si izbrali šest različnih rastnih dejavnikov, ki pozitivno vplivajo na celjenje ran. Rastna dejavnika FGF-2 in PDGF-B vplivata na proliferacijo in migracijo fibroblastov ter drugih celic. TGF- β 1 vpliva na migracijo fibroblastov in njihovo diferenciacijo v miofibroblaste. IGF-I vpliva na kemotakso fibroblastov in poveča preživetje celic. Rastna dejavnika EGFL7 in VEGF-A pa v večji meri vplivata na angiogenezo (Barrientos in sod., 2008). Plazmide s cDNA posameznega rastnega dejavnika smo naročili pri komercialnem ponudniku (Sino Biological, Inc.).

4.2 PRIPRAVA KONSTRUKTOV

Z uporabo tehnik rekombinantne DNA smo zapise za gene *Egfl7*, *Fgf2*, *Igf1*, *Pdgfb*, *Tgfb1* in *Vegfa* preklonirali v plazmid pcDNA3. Pravilnost zaporedij smo preverili s sekveniranjem in s kontrolnimi restrikcijami plazmidov (slika 15).



Slika 15: Kontrolne restrikcije plazmidov z zapisi za rastne dejavnike. Na progo X smo nanesli velikostni standard, na progo A smo nanesli prazen nerezan plazmid pcDNA3, na progo B prazen razrezan plazmid, na proge C - H pa smo nanesli kontrolne restrikcije plazmidov z rastnimi dejavniki (preglednica 26).

Kontrolne restrikcije smo izvedli z uporabo restrikcijskih encimov *HindIII* in *EcoRI*. Pričakovane dolžine dobljenih fragmentov so navedene v preglednici 26. Iz slike 15 in preglednice 26 je razvidno, da se dolžine fragmentov na gelu ujemajo s pričakovanimi dolžinami.

Preglednica 26: Pričakovane dolžine fragmentov po restrikcijski analizi

Oznaka na agaroznem gelu	Ime konstrukta	Restrikcijski encimi	Pričakovane dolžine fragmentov
A	Nerezan pcDNA3 plazmid	/	
B	Rezan pcDNA3 plazmid	<i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i>	5400 bp
C	EGFL7	<i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i>	5400 bp + 825 bp
D	FGF-2	<i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i>	5400 bp + 465 bp
E	IGF-I	<i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i>	5400 bp + 480 bp
F	PDGF-B	<i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i>	5400 bp + 726 bp
G	TGF-β1	<i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i>	5400 bp + 1173 bp
H	VEGF-A	<i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i>	5400 bp + 441 bp

4.3 IZRAŽANJE GENOV

4.3.1 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo

S plazmidi, ki so vsebovali gene za rastne dejavnike, smo transficirali celice HEK293T. Ker nismo imeli reporterskega gena, s katerim bi lahko potrdili izražanje vnesenih genov, smo za potrditev izražanja izvedli kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR). Iz celic transficiranih s posameznim plazmidom, smo izolirali mRNA, jo prepisali v cDNA ter jo uporabili v reakciji qPCR. Vzorcem cDNA iz celic, ki smo jih transficirali z določenim plazmidom, smo dodali specifične začetne oligonukleotide. Za vsak posamezni rastni dejavnik smo uporabili dva para začetnih oligonukleotidov, z izjemo PDGF-B. Dobljene rezultate smo ovrednotili z uporabo primerjalne metode Ct ($2^{\Delta\Delta Ct}$). Po končani kvantitativni verižni reakciji s polimerazo smo z nanosom na gel preverili specifičnost začetnih oligonukleotidov in dolžine nastalih pomnožkov.

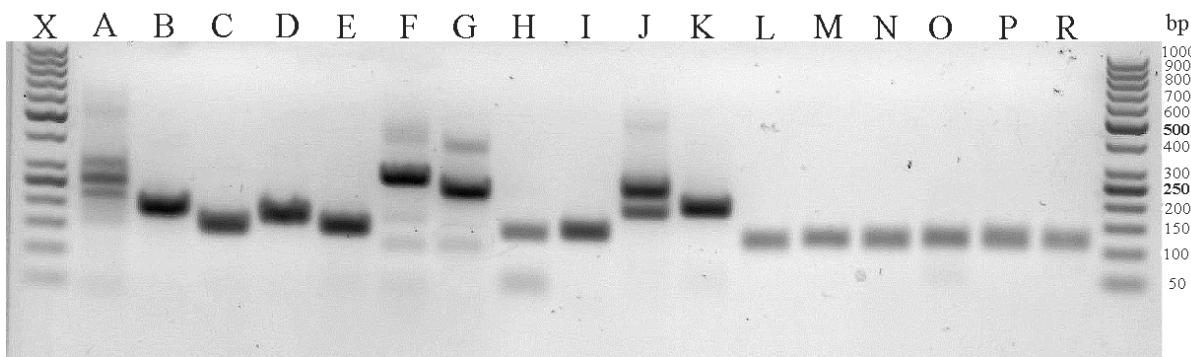
Dobljene vrednosti povečanja ekspresije genov v transficiranih celicah v primerjavi z netransficiranimi celicami, so prikazane v preglednici 27.

Preglednica 27: Izračunane vrednosti povečanja ekspresije genov v transficiranih celicah v primerjavi z netransficiranimi celicami

Oznaka	Konstrukt	Oznake začetnih oligonukleotidov	Faktor povečanja ekspresije
A	EGFL7	4556, 4557	$44,1 \pm 18,3$
B	EGFL7	4558, 4559	$7,6 *10^3 \pm 4,2 *10^2$
C	FGF-2	4540, 4541	$7,1 *10^4 \pm 1,1 *10^3$
D	FGF 2	4542, 4543	$1,1 *10^4 \pm 2,2 *10^2$
E	IGF-I	4544, 4545	$1,5 *10^6 \pm 6,0 *10^3$
F	IGF-I	4546, 4547	$1,0 *10^4 \pm 4,5 *10^3$
G	PDGF-B	4548, 4549	$2,3 *10^5 \pm 1,6 *10^3$
H	TGF-β1	4552, 4553	$3,8 \pm 1,2$
I	TGF-β1	4554, 4555	$3,5 *10^2 \pm 7,8 *10$
J	VEGF-A	4560, 4561	$2,7 *10^3 \pm 5 *10$
K	VEGF-A	4562, 4563	$1,5 *10^3 \pm 10$

Iz rezultatov prikazanih v preglednici 27 vidimo, da v celicah HEK293T pride do transkripcije transficiranih mišjih rastnih dejavnikov.

Dolžino in specifičnost pomnožkov kvantitativne verižne reakcije s polimerazo smo preverili tudi z uporabo agarozne gelske elektroforeze. Na sliki 16 je prikazan gel z nanešenimi produkti kvantitativne verižne reakcije s polimerazo, v preglednici 28 pa so prikazane pričakovane dolžine posameznih pomnožkov. Vzorcem cDNA iz celic, ki smo jih transficirali z določenim plazmidom, smo dodali dva para začetnih oligonukleotidov specifičnih za transficirani rastni dejavnik. Vsakemu vzorcu pa smo dodali tudi specifična začetna oligonukleotida za HPRT (oznaka 1365 in 1366), ki nam je služil kot referenčni gen.



Slika 16: Produkti kvantitativne verižne reakcije s polimerazo. Na progo X smo nanesli velikostni standard. Na proge A – K smo nanesli PCR produkte prehodno transficiranih celic, ki so vsebovali za gen specifične začetne oligonukleotide (preglednica 28). Na proge L – R smo nanesli PCR produkte prehodno transficiranih celic, ki smo jim dodali začetne oligonukleotide za hipoksantin fosforibozil transferazo 1(HPRT) (preglednica 28).

Preglednica 28: Pričakovane dolžine fragmentov po reakciji qPCR in uporabljeni začetni nukleotidi

Oznaka na agaroznem gelu	Konstrukt s katerim smo transficirali celice	Oznaka začetnih oligonukleotidov (specifičnost)	Pričakovane dolžine fragmentov (bp)
A	EGFL7	4556, 4557 (EGFL7)	122
B	EGFL7	4558, 4559 (EGFL7)	187
C	FGF-2	4540, 4541 (FGF-2)	150
D	FGF-2	4542, 4543 (FGF-2)	170
E	IGF-I	4544, 4545 (IGF-I)	148
F	IGF-I	4546, 4547 (IGF-I)	269
G	PDGF-B	4548, 4549 (PDGF-B)	240
H	TGF-β1	4552, 4553 (TGF-β1)	133
I	TGF-β1	4554, 4555 (TGF-β1)	142
J	VEGF-A	4560, 4561 (VEGF-A)	186
K	VEGF-A	4562, 4563 (VEGF-A)	196
L	EGFL-7	1365, 1366 (HPRT)	125
M	FGF-2	1365, 1366 (HPRT)	125
N	IGF-1	1365, 1366 (HPRT)	125
O	PDGF-B	1365, 1366 (HPRT)	125
P	TGF-β1	1365, 1366 (HPRT)	125
R	VEGF-A	1365, 1366 (HPRT)	125

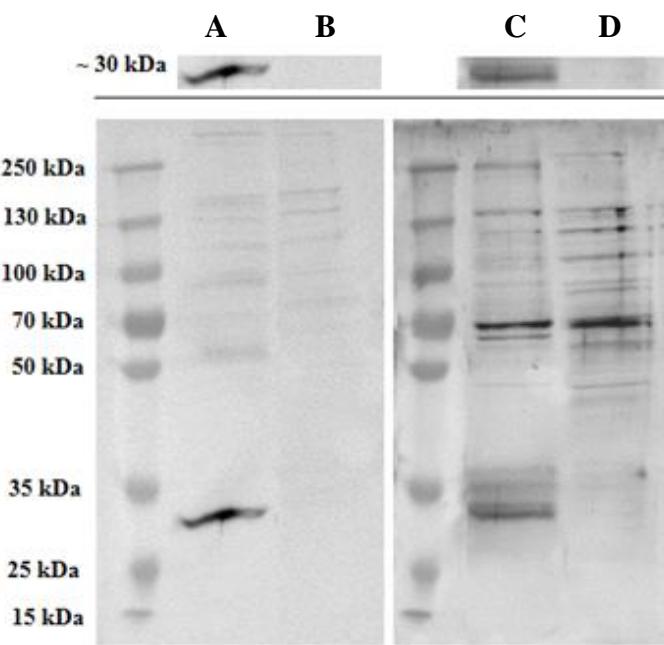
Kot je razvidno iz slike 16 in preglednice 28, se dolžine pomnožkov kvantitativne verižne reakcije s polimerazo, z izjemo vzorcev na progah A in J, ujemajo s pričakovanimi dolžinami. Več fragmentov na progah A in J je posledica nespecifičnega naleganja začetnih oligonukleotidov v človeških celicah. Pri vzorcu A so fragmenti popolnoma nespecifični, pri vzorcu J pa je zgornji fragment nespecifičen, spodnji fragment pa je rezultat specifičnega naleganja oligonukleotidov.

4.4 PRODUKCIJA PROTEINOV

4.4.1 Potrditev izražanja EGFL7

Ker za detekcijo proteina EGFL7 nismo imeli ustreznega encimskoimunskega testa, smo njegovo izražanje potrdili z westeren prenosom. Izražanje proteina EGFL7 v prehodno transficiranih celicah HEK293T in stabilno transficiranih celicah NIH3T3 smo določili z uporabo zajčjih poliklonskih protiteles proti mišjemu EGFL7 ter s kozjimi protitelesi proti zajčjim poliklonskim protitelesom konjugiranimi s hrenovo peroksidazo. Kot negativno kontrolo smo uporabili netransficirane celice HEK293T ali NIH3T3. V posamezni žepk smo nanesli 30 µg celokupnih proteinov, ki smo jih določili s testom BCA.

Na sliki 17 je prikazana membrana z nanešenimi lizati prehodno transficiranih celic HEK293T in lizatom stabilno transficiranih celic NIH3T3.



Slika 17: Membrani z nanešenimi vzorci celic HEK293T in celic NIH3T3 po imunodetekciji. A) Prehodno transficirane HEK293T celice, B) netransficirane celice HEK293T, C) stabilno transficirane celice NIH3T3 in D) netransficirane celice NIH3T3. Na zgornjem delu slike so prikazani fragmenti velikosti ~ 30 kDa; na spodnjem delu slike pa je prikazana celotna membrana z nanešenimi celičnimi lizati.

V celičnem lizatu prehodno transficiranih celic HEK293T in stabilno transficiranih celic NIH3T3 smo potrdili velikost proteina na mestu okoli 30 kDa, kar ustreza pričakovani velikosti proteina EGFL7.

4.4.2 Potrditev izražanja FGF-2, IGF-I, PDGF-B, TGF- β 1 in VEGF-A

S komercialno dostopnimi encimskoimunskimi testi smo določili koncentracije proteinov v vzorcih gojišč, v katerih so rasle prehodno transficirane celice. Celice smo transficirali le s posameznim rastnim dejavnikom, zato smo v vsakem vzorcu določali le rastni dejavnik, s katerim smo transficirali celice. Za kontrolo smo vzeli gojišče, v katerem so rasle netransficirane celice.

Prehodno transficirane celice HEK293T smo gojili v gojišču s serumom in brez njega. Ker smo želeli preveriti kakšen je vpliv seruma na produkcijo in rast transficiranih celic, smo del celic gojili v odsotnosti seruma. V vzorcih gojišča transficiranih celic s serumom, smo izmerili visoke koncentracije rastnih dejavnikov: FGF-2 36,5 ng/ml, IGF-I 333 ng/ml, PDGF-B 1,6 μ g/ml, TGF- β 1 210 ng/ml in VEGF-A 5 μ g/ml (preglednica 29). Izmerjene koncentracije so bile visoko (10 – 1000 x višje) nad koncentracijami rastnih dejavnikov, ki jih izločajo matične celice (Lee in sod., 2009; Lee in sod., 2011).

V gojišču transficiranih celic, katere smo gojili v gojišču brez seruma smo izmerili nižje koncentracije rastnih dejavnikov kot v gojišču transficiranih celic, ki smo jih gojili v gojišču s serumom: FGF-2 33,1 ng/ml, IGF-I 206 ng/ml, PDGF-B 964 ng/ml, TGF- β 1 120 ng/ml in VEGF-A 4,5 μ g/ml (preglednica 29).

Kot kontrolo smo vzeli gojišče netransficiranih celic s serumom in brez njega. Gojišče s serumom smo primerjali z gojiščem brez seruma, ker smo želeli ovrednotiti navzkrižno reaktivnost testov ELISA s komponentami govejega seruma. V gojišču brez seruma, v katerem so rasle netransficirane celice, nismo zaznali rastnih dejavnikov. V vzorcih gojišč s serumom, v katerih so rasle netransficirane celice, smo zaznali zelo nizke koncentracije rastnih dejavnikov PDGF-B in TGF- β 1 (preglednica 29).

V vzorcih prehodno transficiranih celic smo zaznali rastne dejavnike, s katerimi smo transficirali celice. S tem smo dokazali, da prehodno transficirane celice izražajo in izločajo rastne dejavnike v gojišče. Izmerjene koncentracije posameznih rastnih dejavnikov so prikazane v preglednici 29.

Preglednica 29: Koncentracije rastnih dejavnikov v gojiščih, v katerih so rasle celice HEK293T

Celice HEK293T	FGF-2 (ng/ml)	IGF-I (ng/ml)	PDGF-B (ng/ml)	TGF- β 1 (ng/ml)	VEGF-A (ng/ml)
Netransficirane celice s serumom	0	0	0,48	0,82	0
Netransficirane celice brez seruma	0	0	0	0,1	0
Transficirane celice s serumom	36,5	333	1604	210	5000
Transficirane celice brez seruma	33,1	206	964	120	4500

Z encimskoimunskimi testi smo ovrednotili tudi stabilno transficirane celice NIH3T3. V vseh vzorcih gojišča, v katerih so rasle s posameznim rastnim dejavnikom stabilno transficirane celice, smo izmerili in kvantificirali pričakovane rastne dejavnike: FGF-2 7 ng/ml, IGF-I 4 ng/ml, PDGF-B 11,6 ng/ml, TGF- β 1 41,4 ng/ml in VEGF-A 960 ng/ml (preglednica 30). Koncentracije rastnih dejavnikov v gojišču stabilno transficiranih celic so bile kot pričakovano nižje kot pri prehodno transficiranih celicah. Kot kontrolo smo vzeli gojišče, v katerem so rasle netransficirane celice NIH3T3 v prisotnosti seruma. Kljub temu, da so NIH3T3 celice mišjega izvora, z izjemo TGF- β 1 v kontrolnem gojišču nismo zaznali rastnih dejavnikov.

Gojišče, v katerem so rasle stabilno transficirane celice, smo vzeli v dveh časovnih intervalih v razmaku 14 dni. Kot je razvidno iz preglednice 30, stabilno transficirane celice NIH3T3 proizvajajo rastne dejavnike v daljšem časovnem obdobju.

Preglednica 30: Koncentracije rastnih dejavnikov v gojiščih, v katerih so rasle stabilno transficirane celice NIH3T3

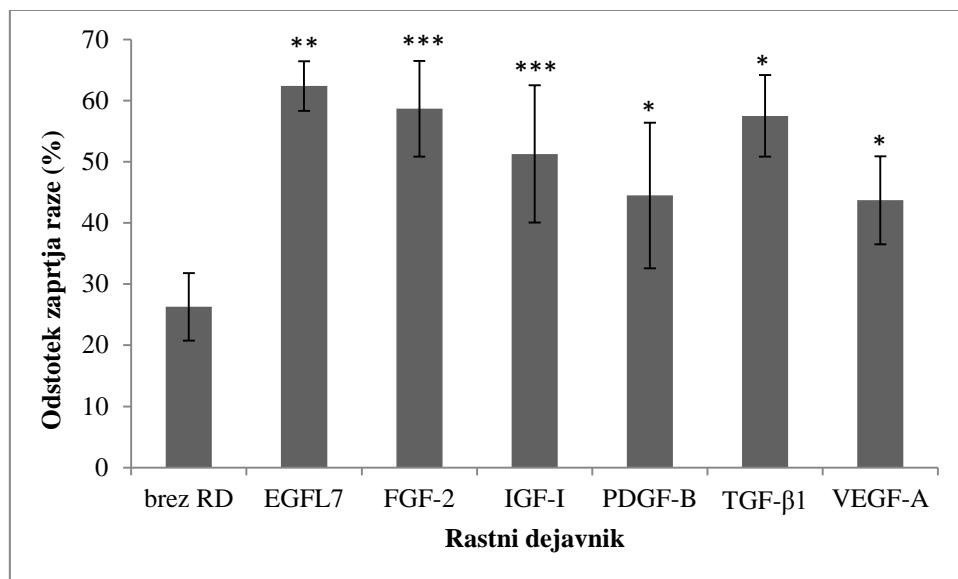
Celice NIH 3T3	FGF-2 (ng/ml)	IGF-I (ng/ml)	PDGF-B (ng/ml)	TGF- β 1 (ng/ml)	VEGF-A (ng/ml)
Netransficirane celice	0	0	0	0,8	0
Stabilno transficirane celice (1. dan)	7	4	11,6	41,4	960
Stabilno transficirane celice (14. dan)	55,8	28,4	210	70,1	557

4.5 TEST HITROSTI ZAPIRANJA RAZE

Za določitev vpliva posameznega rastnega dejavnika na hitrost zapiranja rane v pogojih *in vitro*, smo izvedli test hitrosti zapiranja raze (metode 3.2.9). V konfluentni monosloj celic NIH3T3 smo s pipetnim nastavkom naredili razo. Celicam smo dodali medij, v katerem so rasle s posameznim rastnim dejavnikom prehodno transficirane celice HEK293T. Koncentracije rastnih dejavnikov v posameznem mediju smo izmerili z uporabo encimskoimunskih testov. Test hitrosti zapiranja raze smo izvedli ob različnih koncentracijah rastnih dejavnikov.

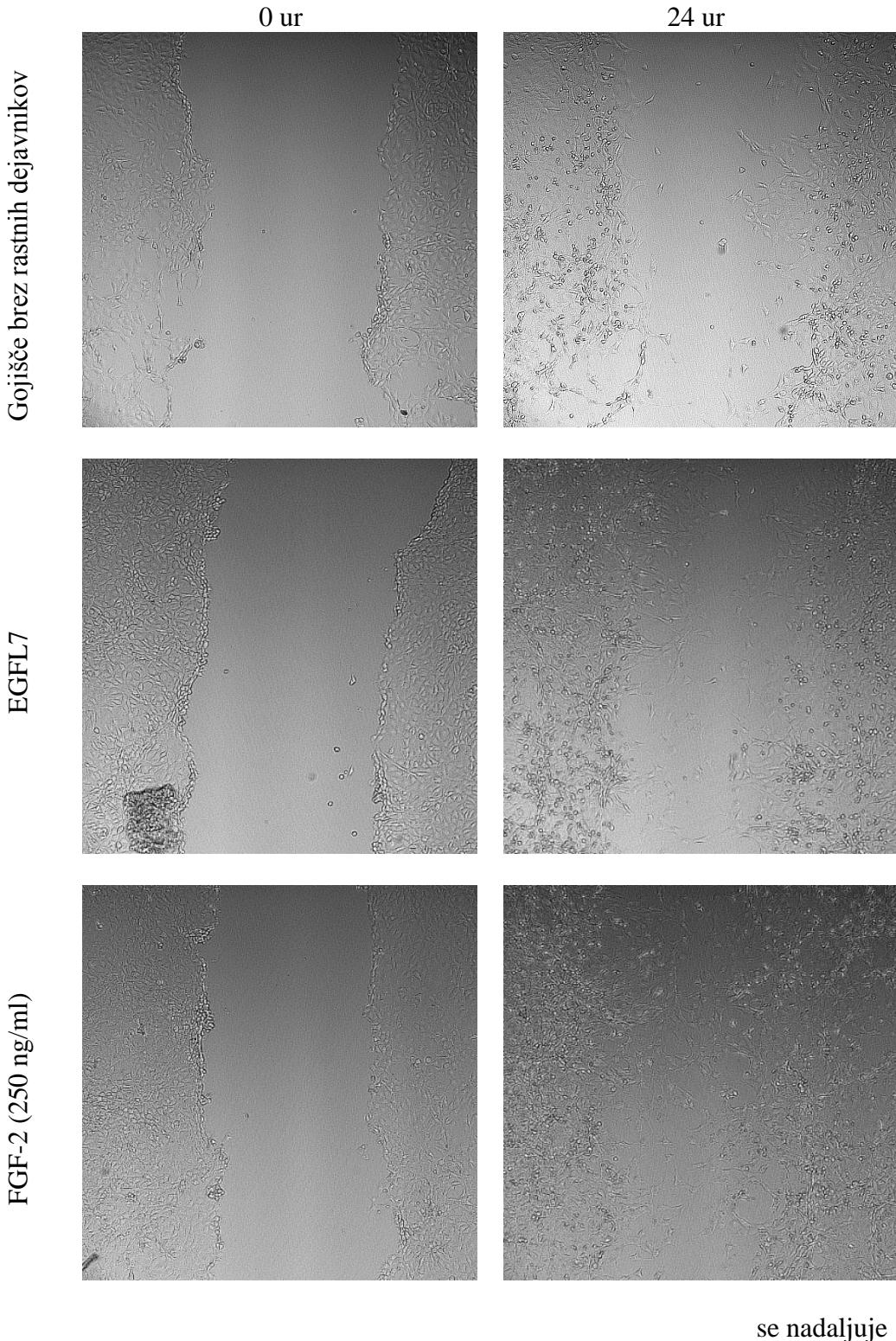
S konfokalnim mikroskopom smo slikali raze ob času 0 in 24 ur po dodatku medija z rastnimi dejavniki. Slike smo kvantificirali z uporabo programa ImageJ (metode 3.2.11) in iz dobljenih podatkov izračunali odstotek zaprtja raze po dodatku posameznega rastnega dejavnika.

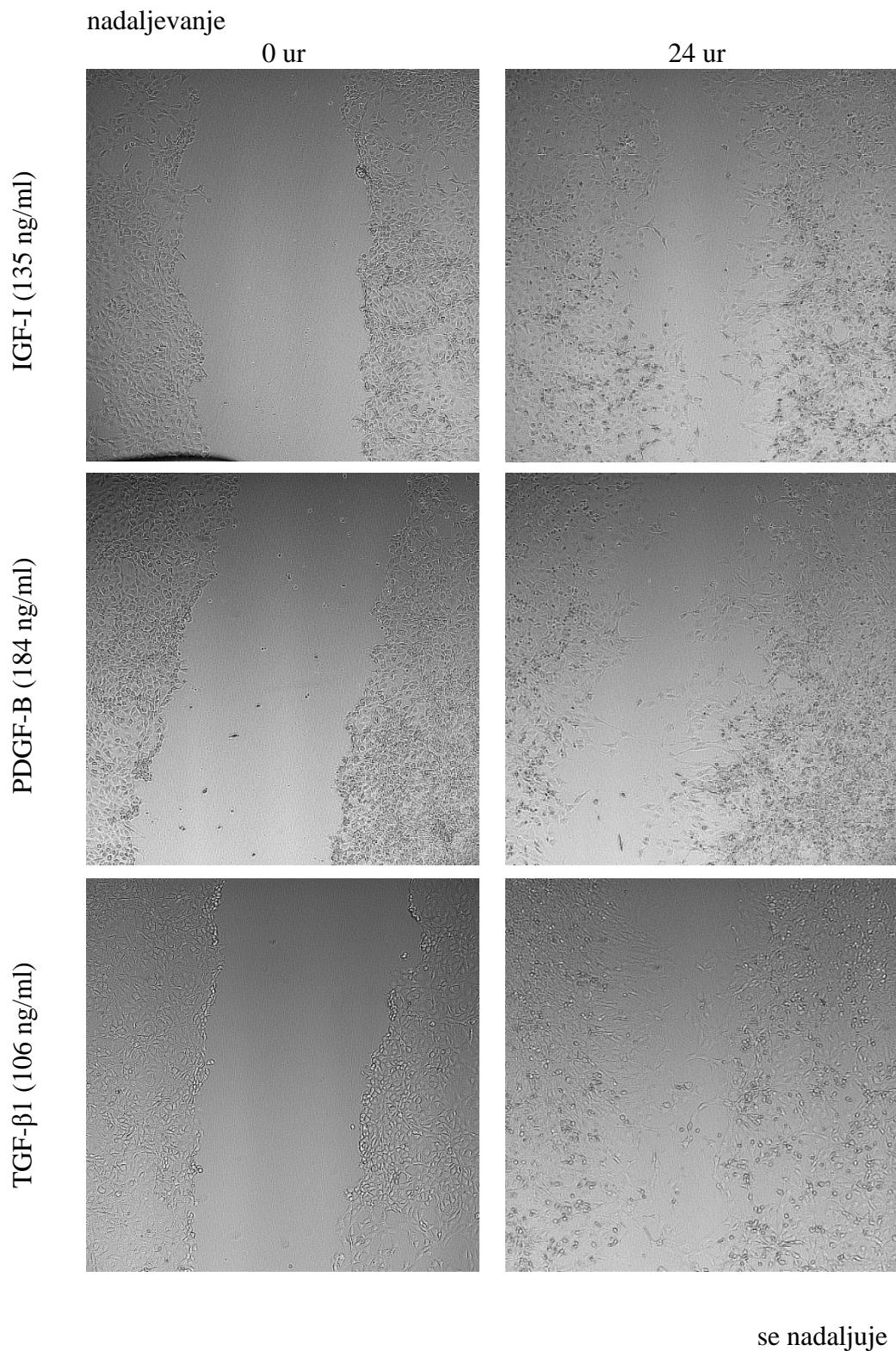
Na celice smo najprej nanesli medij z visokimi koncentracijami rastnih dejavnikov, da bi testirali njihov vpliv na hitrost zapiranja raze. Iz grafa (slika 18) in slike 19 je razvidno, da rastni dejavniki pospešijo zapiranje raze v primerjavi s kontrolo.



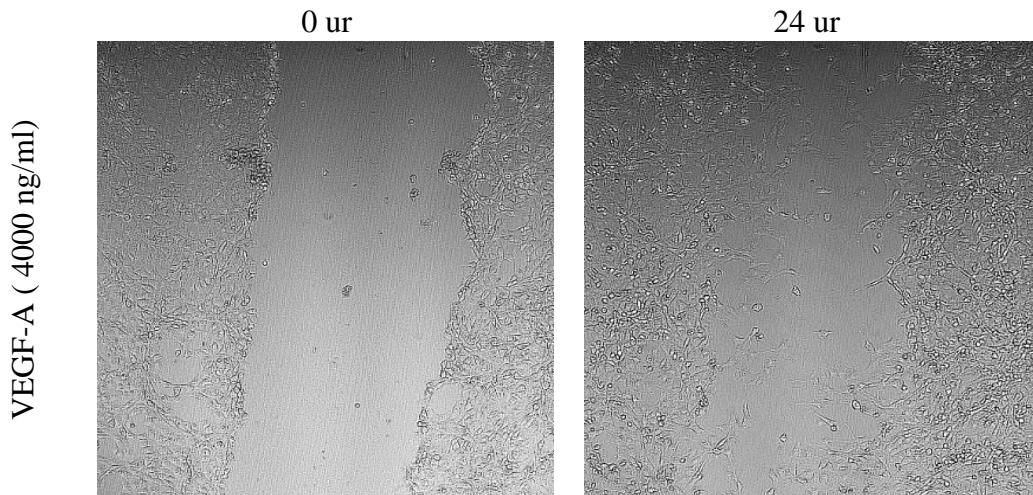
* $P < 0,1$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

Slika 18: Graf odstotka zaprtja raze ob dodatku visokih koncentracij rastnih dejavnikov po 24 urah. Na celice smo nenesli gojišče brez rastnih dejavnikov (RD), ter gojišča, ki vsebujejo rastne dejavnike s koncentracijami: FGF-2 250 ng/ml, IGF-I 135 ng/ml, PDGF-B 184 ng/ml, TGF- β 1 106 ng/ml in VEGF-A 4000 ng/ml.





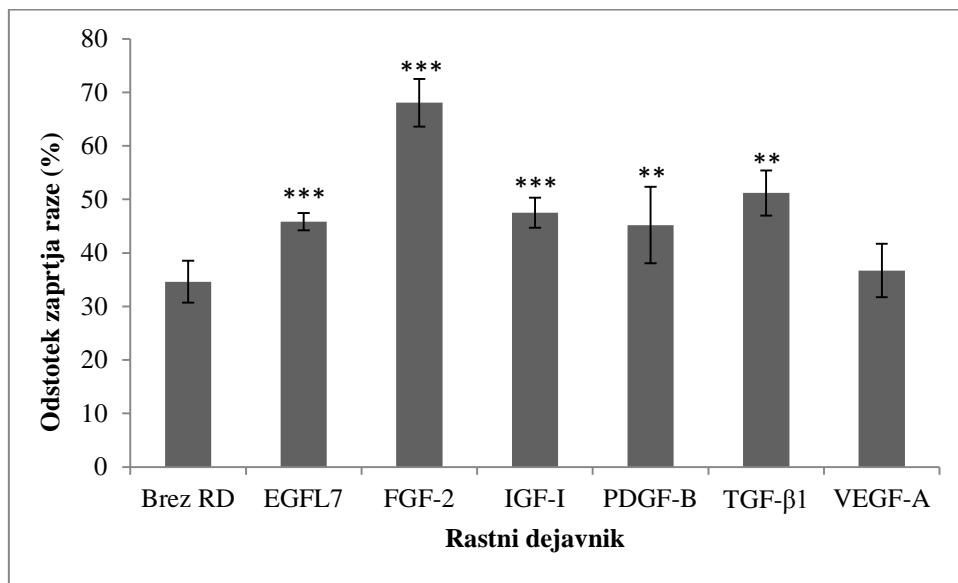
nadaljevanje



Slika 19: Slika zapiranja raz ob dodatku medija z rastnimi dejavniki. Na sliki so prikazane slike raz, z dodanimi rastnimi dejavniki ob času 0 in po 24 urah. V oklepaju je navedena končna koncentracija rastnega dejavnika v mediju.

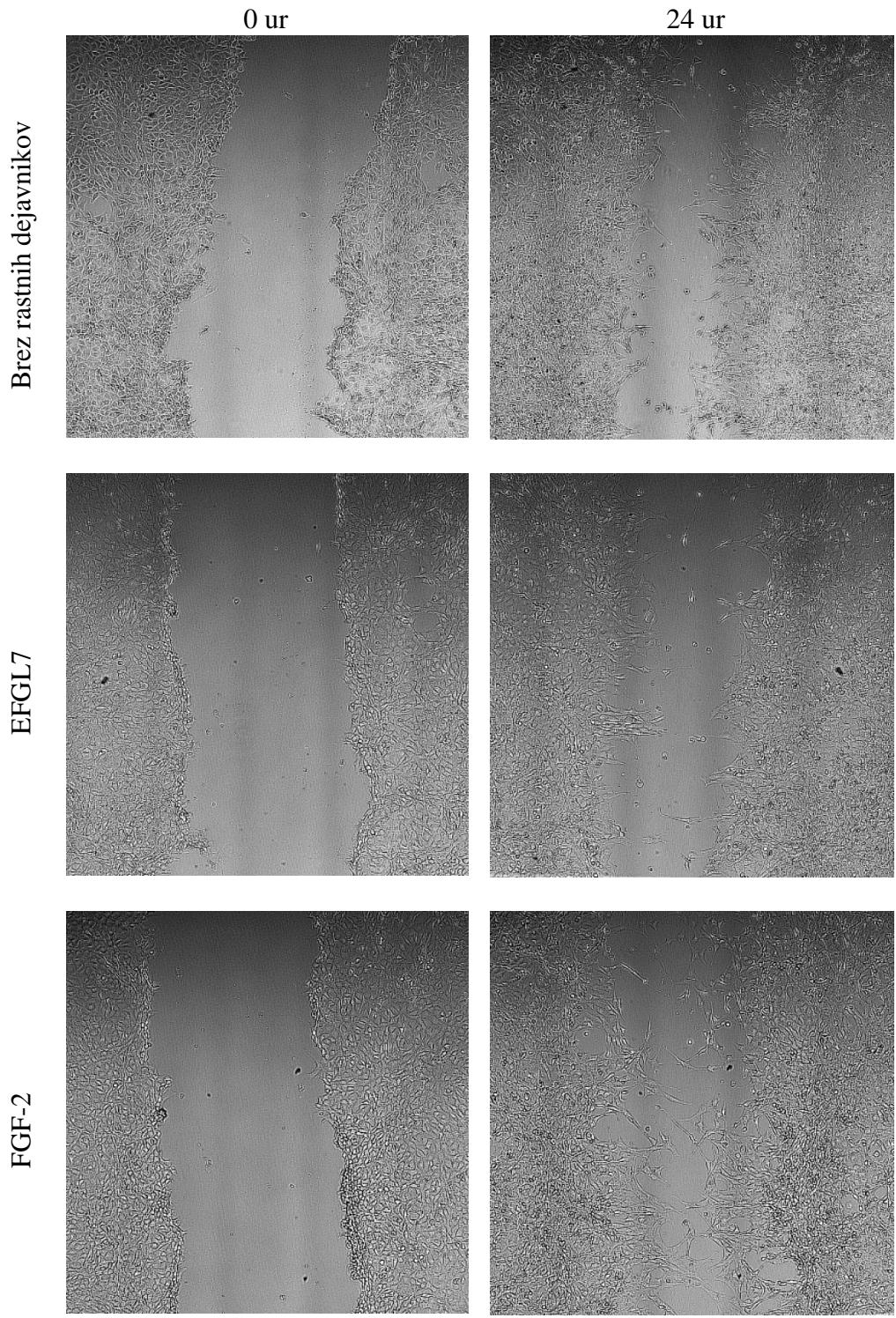
Iz grafa (slika 18) in slike 19 lahko vidimo, da vsi rastni dejavniki pospešijo zapiranje raze v primerjavi s kontrolo (~ 27 % zaprtje raze). Največji vpliv na hitrost zapiranja raze imajo rastni dejavniki EGFL7, FGF-2 (250 ng/ml) in TGF- β 1 (106 ng/ml), ki so povzročili približno 60 % zaprtje raze v 24 urah. Nekoliko manjši vpliv na hitrost zapiranja raze imajo IGF-I (135 ng/ml), PDGF-B (184 ng/ml) in VEGF-A (4 μ g/ml), pri katerih se je raza zaprla za ~ 50 % (IGF-I) oziroma ~ 45 % (PDGF-B in VEGF-A).

Da bi lažje ocenili vpliv posameznega rastnega dejavnika na hitrost zapiranja raze v modelu *in vitro*, smo na raze dodali enake koncentracije rastnih dejavnikov. Medij, v katerem so rasle prehodno transficirane celice, smo redčili z medijem, v katerem so rasle netransficirane celice in tako pridobili želene koncentracije rastnih dejavnikov v gojišču. Na celice NIH3T3 z razo smo dodali 35 ng/ml posameznega rastnega dejavnika (z izjemo EGFL7, ki smo ga redčili desetkrat, saj nismo imeli testa ELISA, s katerim bi lahko določili njegovo koncentracijo). Dobljeni rezultati, so prikazani na sliki 20 in 21.

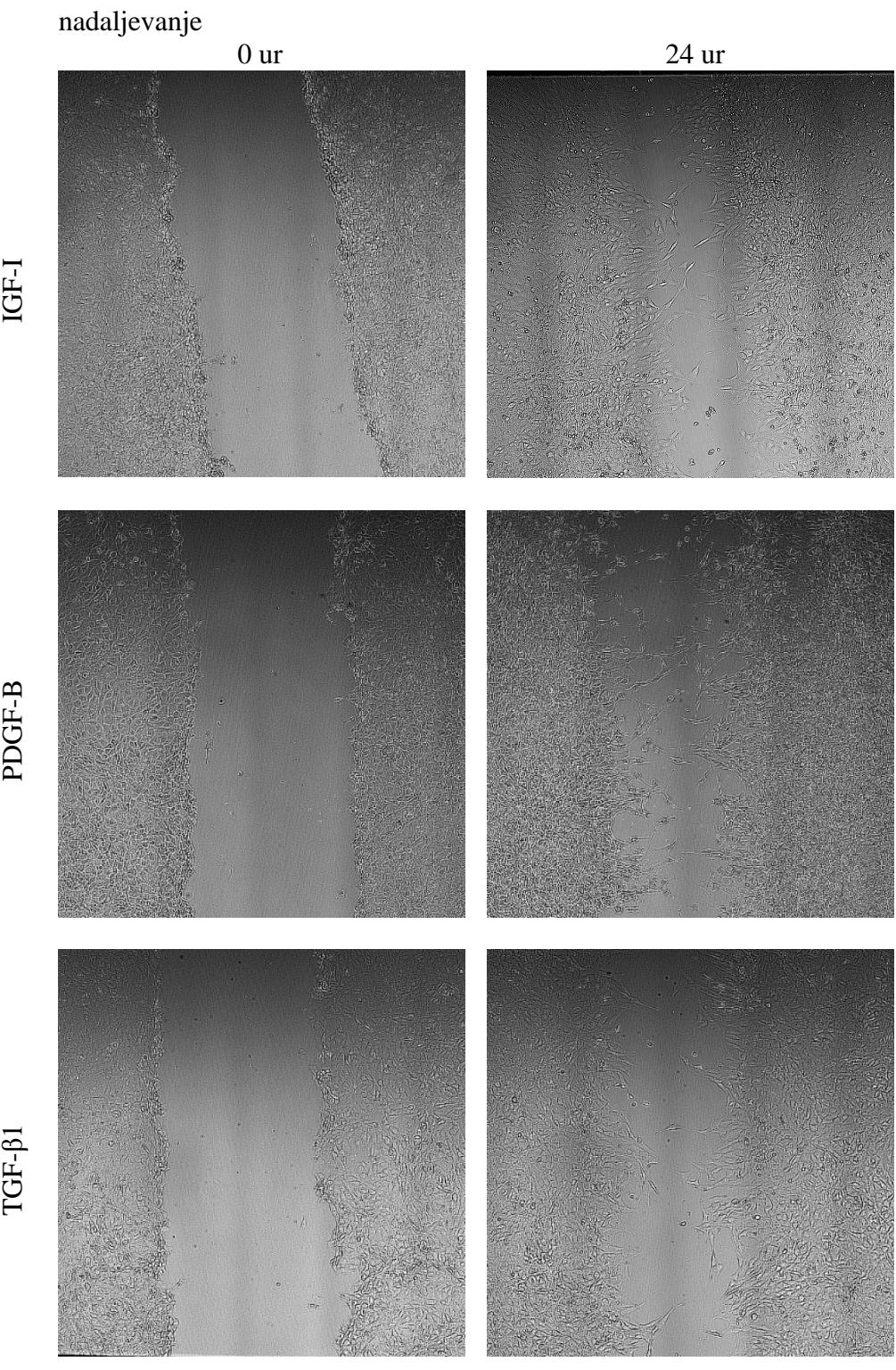


** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

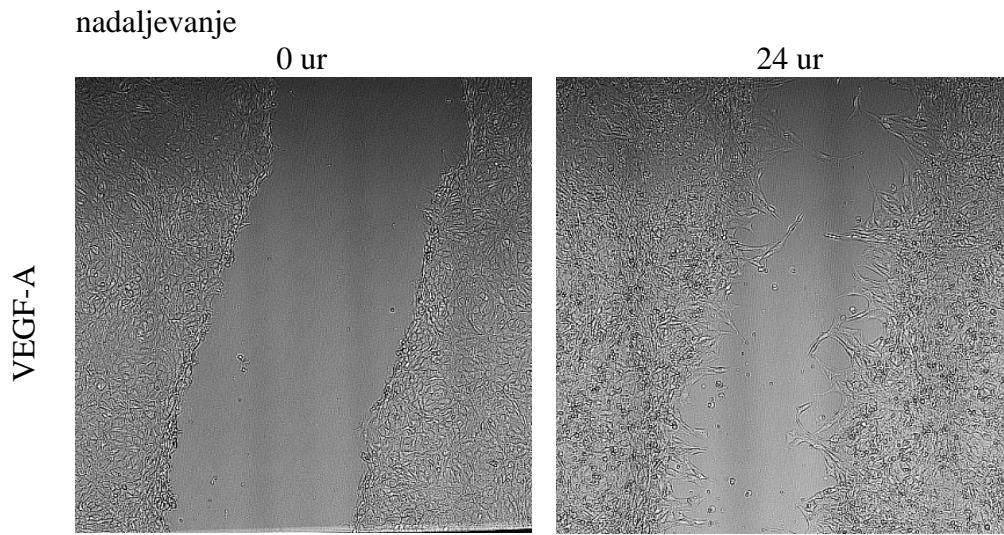
Slika 20: Graf odstotka zaprtja raze ob dodatku enakih koncentracij rastnih dejavnikov po 24 urah. Na celice smo nanesli gojišče brez rastnih dejavnikov (RD), ter gojišča z rastnimi dejavniki v koncentraciji 35 ng/ml, z izjemo EGFL7, ki smo ga redčili desetkrat.



se nadaljuje



se nadaljuje

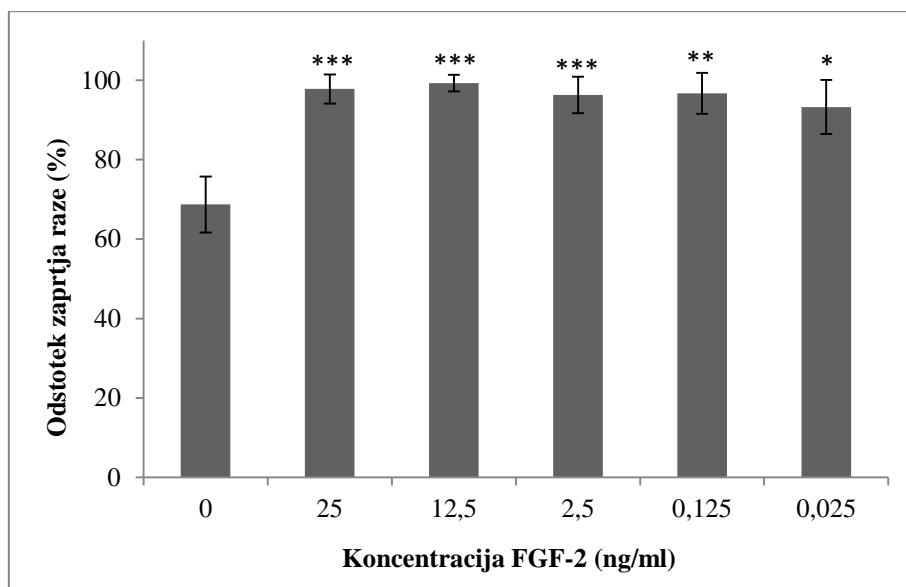


Slika 21: Slika zapiranja raz ob dodatku medija z rastnimi dejavniki v enakih koncentracijah (35ng/ml). Na sliki so prikazane slike raz, z dodanimi rastnimi dejavniki ob času 0 in po 24 urah

Iz grafa (slika 20) in slike 21 lahko vidimo, da rastni dejavniki v nižjih koncentracijah (35 ng/ml) še vedno pozitivno vplivajo na zapiranje raze, vendar pa je njihova učinkovitost v primerjavi z višjimi koncentracijami rastnih dejavnikov slabša. Največji vpliv na zapiranje raze ima FGF-2, ki je povzročil $\sim 68\%$ zaprtje raze po 24 urah. Sledijo mu TGF- β 1, ob dodatku katerega je prišlo do $\sim 50\%$ zaprtja raze. Rastni dejavniki EGFL7, IGF-I in PDGF-B, so imeli primerljiv vpliv na hitrost zapiranja raze, ki se je ob njihovem dodatku zmanjšala za $\sim 45\%$. Najslabši vpliv na hitrost zapiranja raze je imel VEGF-A, ki se po odstotku zaprtja raze ($\sim 35\%$) ni razlikoval od kontrole.

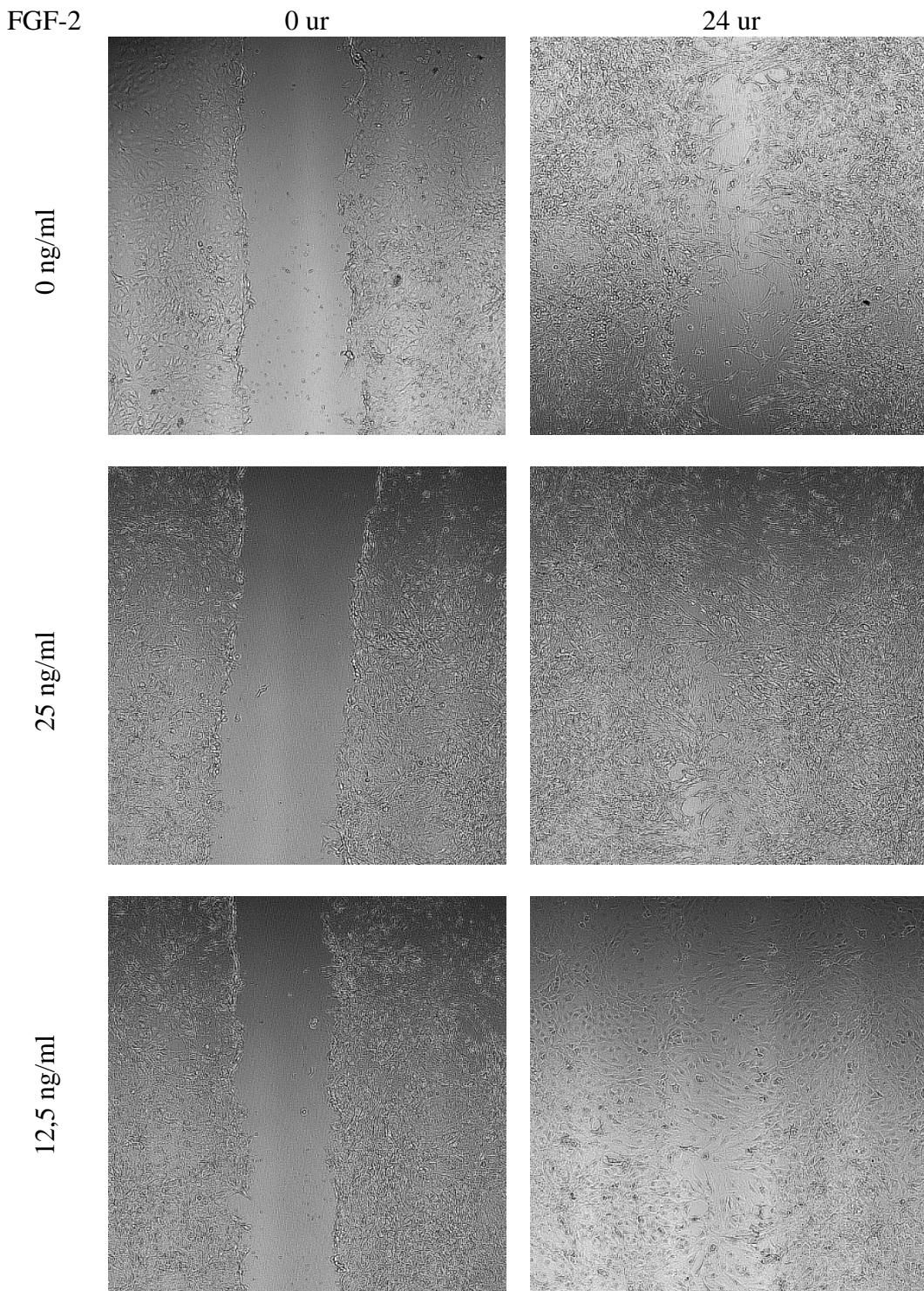
Ker se je rastni dejavnik FGF-2 izkazal za najučinkovitejšega pri nizkih koncentracijah, smo raziskali kakšen je njegov vpliv pri nizkih fizioloških koncentracijah. Za določitev območja koncentracije rastnega dejavnika FGF-2, ki pozitivno vpliva na rast celic, smo naredili redčitev rastnega dejavnika FGF-2. Na celice smo nanesli rastni dejavnik v koncentraciji med 25 ng/ml in 25 pg/ml. Območje koncentracije smo določili s pomočjo podatkov v literaturi, ki kažejo, da se koncentracija FGF-2 pri normalnem celjenju rane giblje okoli 30 - 45 pg/ml (Ono in sod., 1995; Schulz in Gibson, 2012), prav tako pa je ta koncentracija primerljiva s koncentracijo FGF-2 v mediju, v katerem so rasle matične celice (Lee in sod., 2009).

Vplivi različnih koncentracij rastnega dejavnika FGF-2 na hitrost zapiranja raze so prikazani na slikah 22 in 23.

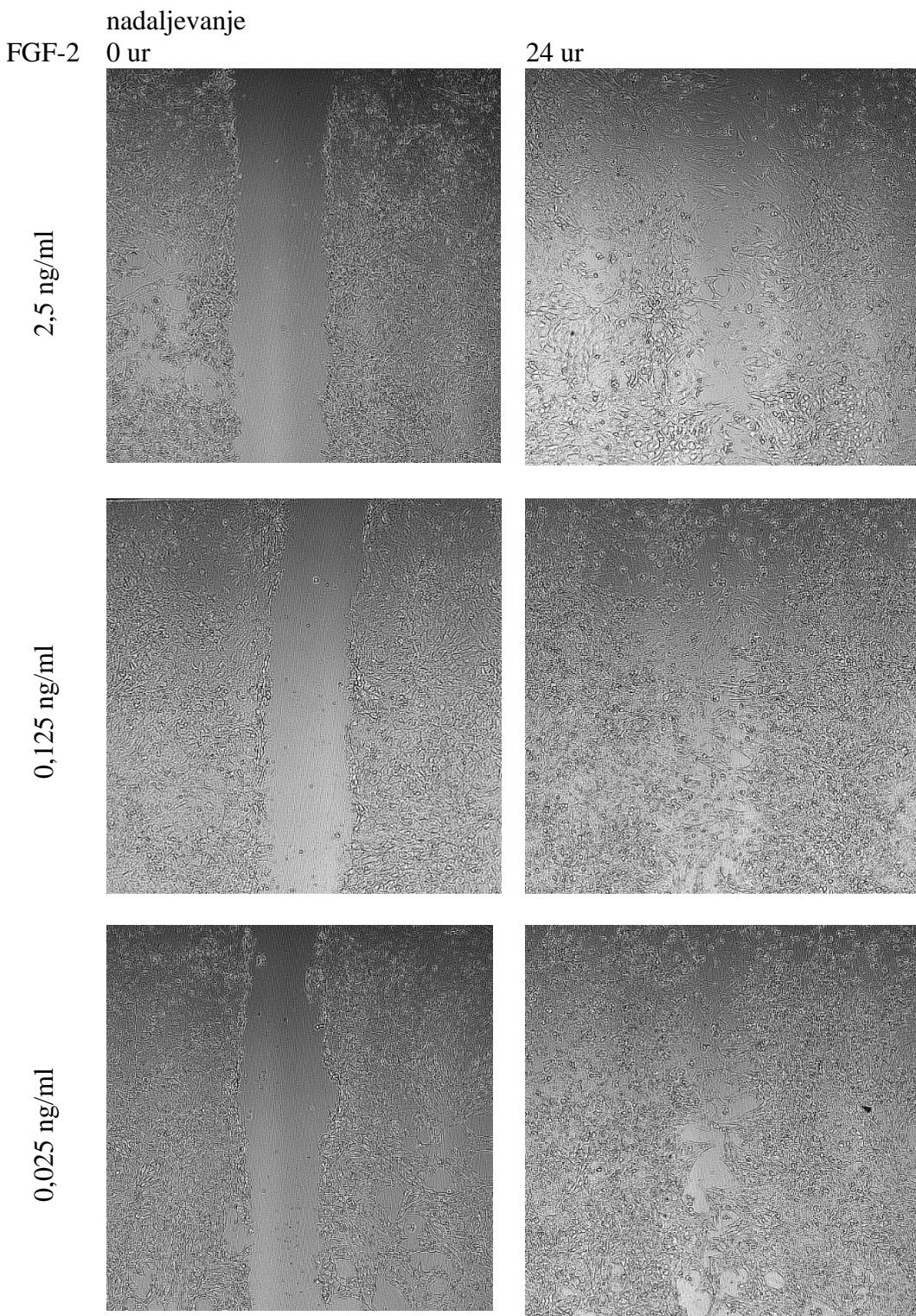


* $P < 0,1$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

Slika 22: Graf odstotka zaprtja raz ob dodatku različnih koncentracij rastnega dejavnika FGF-2 po 24 urah. Na celice smo nanesli rastni dejavnik FGF-2 v različnih koncentracijah med 25 ng/ml in 25 pg/ml.



se nadaljuje



Slika 23: Slika zaprtja raz ob dodatku medija, z različnimi koncentracijami rastnega dejavnika FGF-2. Na sliki so prikazane slike raz ob času 0 in po 24 urah

Iz grafa (slika 22) in slike 23 je razvidno, da rastni dejavniki FGF-2 izboljša hitrost zapiranja raze pri koncentraciji med 25 ng/ml in 25 pg/ml. Vidimo, da se je raza ob dodatku vseh testiranih koncentracij FGF-2 po 24 urah skoraj popolnoma zaprla, medtem ko se je kontrolna raza zaprla le ~ 70 %. V testiranem območju nismo zaznali koncentracijske odvisnosti hitrosti zapiranja raze kar kaže, da je efektivna koncentracija FGF-2 lahko še bistveno nižja.

5 RAZPRAVA

V okviru magistrske naloge smo želeli pripraviti in ovrednotiti nekatere rastne dejavnike, ki jih izločajo matične celice in pozitivno delujejo na celjenje ran. S pomočjo literature smo si izbrali rastne dejavnike EGFL7, FGF-2, IGF-I, PDGF-B, TGF- β 1 in VEGF-A, ki pozitivno vplivajo na celjenje ran (Bao in sod., 2009; Brown in sod., 1994; Campagnolo in sod., 2005; Kottakis in sod., 2011; Todorović in sod., 2008).

Izbrane gene za rastne dejavnike smo z uporabo molekularnih metod vstavili v plazmid, primeren za izražanje genov v sesalskih celicah. Pravilnost zaporedja konstruktov smo preverili s kontrolno restrikcijo, ki je pokazala, da se velikosti fragmentov po restrikciji ujemajo s pričakovanimi dolžinami (slika 15). Pravilnost zaporedja pripravljenih konstruktov smo potrdili tudi s sekveniranjem DNA. S tem smo dokazali, da smo uspešno prenesli zapise za posamezne rastne dejavnike v plazmide, primerne za uporabo v sesalskih celicah.

5.1 IZRAŽANJE GENOV V TRANSFICIRANIH CELICAH

Eden od ciljev magistrske naloge je bil dokazati izražanje vnesenih rastnih dejavnikov v sesalskih celicah. Za detekcijo izražanja genov smo uporabili metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo.

5.1.1 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo

Za kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo smo najprej izolirali mRNA s posameznim rastnim dejavnikom prehodno transficiranih celic HEK293T in jo prepisali v cDNA. Vzorce cDNA smo uporabili v kvantitativni verižni reakciji s polimerazo, kjer smo vzorcu celic, prehodno transficiranih z določenim rastnim dejavnikom, dodali dva različna para začetnih oligonukleotidov. Dobljene vrednosti smo ovrednotili z uporabo primerjalne metode $\Delta\Delta Ct$, ki nam poda faktor povečanja ekspresije gena v transficiranih celicah v primerjavi z netransficiranimi celicami. Za večino vzorcev smo po preračunu dobili vrednosti višje od 10 (preglednica 27), kar kaže na signifikantno povečanje izražanja rastnih dejavnikov v prehodno transficiranih celicah v primerjavi z netransficiranimi celicami. Pod to vrednostjo je le vzorec celic prehodno transficiranih s TGF- β 1 z dodanimi drugimi parom začetnih nukleotidov (4554 in 4555). V vzorcu TGF- β 1 z dodanimi drugimi parom začetnih oligonukleotidov (4552 in 4553) smo uporabili enako cDNA kot za prvi par začetnih oligonukleotidov (4554 in 4555). Zato je nizka vrednost povečanja izražanja najverjetneje posledica nespecifičnega naleganja drugega para začetnih oligonukleotidov v netransficiranih celicah in ne odsotnosti mRNA za TGF- β 1 v transficiranih celicah.

Preračunane vrednosti povečanja izražanja se med vzorci močno razlikujejo. V transficiranih človeških celicah HEK293T, je prišlo do izražanja vnesenih genov za mišje rastne dejavnike, zato je bila koncentracija mRNA posameznega rastnega dejavnika v transficiranih celicah visoka. Kot kontrolo smo vzeli mRNA netransficiranih celic HEK293T, ki ne izražajo mišjih rastnih dejavnikov. Zaradi odsotnosti genov za mišje rastne dejavnike v celicah HEK293T in posledično nezmožnosti naleganja začetnih oligonukleotidov na tarčno mRNA, smo po prepisu v cDNA dobili le nekaj nespecifičnih pomnožkov. Ker pri metodi $\Delta\Delta Ct$ vrednosti transficiranih celic normaliziramo na vrednosti kontrole, smo po preračunu dobili visoke vrednosti povišanja ekspresije, saj smo ekspresijo normalizirali na celice, ki rastnih dejavnikov ne izražajo.

Po končani kvantitativni verižni reakciji s polimerazo smo želeli preveriti specifičnost uporabljenih začetnih oligonukleotidov. Produkte reakcije smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo. Iz slike 16 je razvidno, da dolžine večine fragmentov ustrezajo pričakovanim dolžinam, kar pomeni, da so začetni oligonukleotidi nalegali specifično. Večje število različnih pomnožkov je vidnih le pri vzorcih A in J (slika 16) in so posledica nespecifičnega naleganja uporabljenih začetnih oligonukleotidov v prehodno transficiranih celicah. Pri vzorcu A so začetni oligonukleotidi nalegali popolnoma nespecifično. Pri vzorcu J pa dolžina krajšega fragmenta ustreza pričakovani dolžini specifičnega produkta, daljši fragment pa je posledica nespecifičnega naleganja. Manjši delež nespecifičnega naleganja v celicah HEK293T je bil pričakovani, saj so bili začetni oligonukleotidi optimirani za uporabo v mišjih celicah.

Z uporabo metode kvantitativne verižne reakcije s polimerazo smo dokazali, da prehodno transficirane celice HEK293T izražajo pričakovane rastne dejavnike in s tem potrdili našo hipotezo o izražanju transficiranih dejavnikov v sesalskih celicah.

5.2 PRODUKCIJA PROTEINOV V SESALSKIH CELICAH

Z uporabo western prenosa in encimskoimunskega testa smo na proteinском nivoju dokazali, da celice producirajo in izločajo rastne dejavnike in s tem potrdili eno od naših hipotez.

5.2.1 Western prenos za določitev izražanja proteinov

Izražanje proteina EGFL7 smo potrdili z western prenosom in encimskoimunske detekcijo proteina na membrani. Na sliki 17 je jasno vidna lisa na mestu 30 kDa, ki odgovarja velikosti proteina EGFL7. Prisotnost proteina EGFL7 smo pokazali v celičnih lizatih prehodno transficiranih celic HEK293T in stabilno transficiranih celicah NIH3T3. Naši rezultati se skladajo z rezultati Schmidt in sod. (2007), ki so pri čezmernem izražanju EGFL7 v fibroblastih pokazali visoke koncentracije EGFL7 v celičnem lizatu (Schmidt in sod., 2007).

Ker smo na gel nanesli 30 µg celokupnih proteinov, so razlike v prisotnosti lis med transficiranimi in netransficiranimi celicami pri velikosti 30 kDa posledica izražanja proteina EGFL7 s strani celice in ne posledica neenakomernega nanosa vzorcev in posledično nespecifične vezave protiteles.

5.2.2 Encimskoimunski testi za določitev izražanja proteinov

Za nadaljnjo potrditev izražanja rastnih dejavnikov in njihovo kvantifikacijo, smo uporabili encimskoimunske teste. Koncentracije rastnih dejavnikov smo izmerili v gojišču, v katerem so rasle prehodno transficirane celice HEK293T in stabilno transficirane celice NIH3T3. Kot kontrolo smo vzeli gojišče, v katerem so rasle netransficirane celice.

Ker smo želeli preveriti, ali pride do navzkrižne reaktivnosti testov ELISA s komponentami govejega seruma, smo koncentracije rastnih dejavnikov najprej izmerili v gojišču z ali brez seruma, kjer so rasle netransficirane celice. V gojišču, kjer so rasle netransficirane celice v odsotnosti seruma, nismo zaznali rastnih dejavnikov. V gojišču, v katerem so rasle netransficirane celice v prisotnosti seruma, smo zaznali le nizke koncentracije PDGF-B in TGF-β1. Ker smo nizke koncentracije rastnih dejavnikov zaznali le v gojišču s serumom netransficiranih celic, lahko sklepamo, so izmerjene koncentracije rastnih dejavnikov posledica navzkrižne reaktivnosti testa s komponentami govejega seruma v gojišču. Te koncentracije so bile v primerjavi z gojiščem, v katerem so rasle transficirane celice, zanemarljivo nizke. Iz tega lahko zaključimo, da je navzkrižna reaktivnost testov ELISA s komponentami govejega seruma nizka. S tem smo dokazali, da so visoke koncentracije rastnih dejavnikov, ki smo jih izmerili v gojišču, posledica njihove produkcije s strani stabilno transficiranih celic.

Iz rezultatov prikazanih v preglednici 29 vidimo, da prihaja do razlik v koncentracijah rastnih dejavnikov v gojišču, v katerem so rasle prehodno transficirane celic ob odsotnosti ali prisotnosti seruma. Razlike v produkciji rastnih dejavnikov ne izvirajo iz neenakomerne transfekcije, saj je bila uspešnost transfekcije v obeh primerih (celice s serumom in brez njega) primerljiva (rezultati niso prikazani). Nižje koncentracije rastnih dejavnikov v gojišču brez seruma so posledica slabše rasti celic in posledično slabše produkcije rastnih dejavnikov. Vendar pa so izmerjene koncentracije rastnih dejavnikov v gojišču brez seruma še vedno visoko nad fiziološkimi vrednostmi. Živalski serum v pripravkih za terapevtsko uporabo ni zaželen, saj s serumom v gojišče vnašamo živalske kontaminante, ki lahko pri pacientih sprožijo imunski odziv ali pa vsebujejo potencialne patogene (Gruen in Grabel, 2006). Naši

rezultati kažejo, da bi celice za pridobivanje rastnih dejavnikov lahko gojili v gojišču brez serum, kar bi bilo primernejše za potencialno terapevtsko uporabo.

Z encimskoimunskimi testi smo izmerili tudi koncentracije rastnih dejavnikov v gojiščih, kjer so rasle s posameznim rastnim dejavnikom stabilno transficirane celice NIH3T3. V gojiščih smo detektirali pričakovane rastne dejavnike (preglednica 30) in s tem pokazali, da stabilno transficirane celice izločajo želene rastne dejavnike v gojišče. Za kontrolo smo vzeli gojišče, v katerem so rasle netransficirane celice NIH3T3. V gojišču, v katerem so rasle netransficirane celice NIH3T3, z izjemo nizkih koncentracij TGF- β 1 nismo detektirali rastnih dejavnikov. Prisotnost TGF- β 1 v gojišču netransficiranih celic je posledica navzkrižne reaktivnosti ELISA testa s komponentami serumata v gojišču. Zaradi skorajšnje odsotnosti rastnih dejavnikov v mediju netransficiranih celic lahko zaključimo, da so izmerjene koncentracije posameznih rastnih dejavnikov v gojišču, kjer so rasle transficirane celice, posledica njihove produkcije in Izločanja s strani stabilno transficiranih celic, ter da same celice NIH3T3 ne izražajo rastnih dejavnikov v zaznavni koncentraciji.

Za potrditev uspešnosti stabilne transfekcije smo izmerili koncentracije rastnih dejavnikov v dveh časovnih točkah v razmaku 14 dni. Na podlagi rezultatov, prikazanih v preglednici 30 vidimo, da so stabilno transficirane celice izločale rastne dejavnike tudi po preteku 14 dni, njihova produkcija pa se je še celo povečala. Povečana produkcija rastnih dejavnikov je najverjetneje posledica daljšega seleksijskega pritiska in posledično selekcije na račun boljših producentov. Če bi želeli pridobiti stabilne produksijske linije, bi morali iz populacije celic selekcionirati posamezne klone. S selekcijo bi pridobili stabilno celično linijo, ki bi proizvajala rastne dejavnike v znani koncentraciji in si tako zagotovili konstantno produkcijo rastnih dejavnikov, ki bi jih lahko uporabili v terapevtske namene.

Z uporabo encimskoimunskih testov smo potrdili našo hipotezo in pokazali, da stabilno in prehodno transficirane celice izražajo rastne dejavnike in jih izločajo v gojišče.

5.3 POVEČANJE HITROSTI ZAPIRANJA RAZ Z DODATKOM MEDIJA Z RASTNIMI DEJAVNIKI

Za določitev vpliva posameznega rastnega dejavnika na hitrost migracije in proliferacije celic NIH3T3 smo izvedli test hitrosti zapiranja raze, ki je enostavna in cenovno ugodna metoda, ki se uporablja za preučevanje migracije in proliferacije celic v pogojih *in vitro* (Liang in sod., 2007).

Izmed izbranih rastnih dejavnikov, je največji vpliv na zapiranje raze imel rastni dejavnik FGF-2. Po podatkih iz literature, FGF-2 v pogojih *in vivo* vpliva na proliferacijo in migracijo fibroblastov in keratinocitov (Barrientos in sod., 2008). Vendar pa na proliferacijo in

migracijo fibroblastov tekom celjenja rane vplivata tudi PDGF-B in IGF-I, zato bi pričakovali, da bi bil vpliv teh dejavnikov primerljiv. Kot kažejo naši rezultati, FGF-2 na migracijo in proliferacijo fibroblastov vpliva v nižjih koncentracijah kot ostala dva rastna dejavnika. Rastni dejavniki TGF- β 1 tekom normalnega celjenja rane vpliva na številne celične tipe tekom celotnega procesa celjenja, ter pozitivno vpliva na celjenje ran (Barrientos in sod., 2008; Werner in Grose, 2003). Naši rezultati se skladajo s podatki iz literature, saj smo pokazali, da TGF- β 1 pozitivno vpliva na zapiranje raze tudi pri koncentraciji 35 ng/ml. Rastna dejavnika VEGF-A in EGFL-7 v fizioloških pogojih vplivata predvsem na angiogenezo (Barrientos et al. 2008) zato nismo pričakovali, da bosta imela večji vpliv na modelu celjenja rane v pogojih *in vitro*. Izkazalo se je, da visoke in zmerne koncentracije EGFL-7, ter visoke koncentracije VEGF-A, vplivajo tudi na fibroblaste in pozitivno vplivajo na zapiranje raze.

Iz rezultatov vidimo, da dodajanje rastnih dejavnikov pospeši hitrost zapiranja raze v primerjavi s kontrolo brez rastnih dejavnikov v pogojih *in vitro*. Vplivi različnih rastnih dejavnikov na hitrost zapiranja raze so različni. Iz slike 18 in 19 vidimo, da je bilo zapiranje raze najhitrejše v prisotnosti EGFL7, FGF-2 (250 ng/ μ l) in TGF- β 1 (106 ng/ μ l). Ob dodatku VEGF-A (4000 ng/ μ l) je bila hitrost zapiranja raze počasnejša, vendar še vedno boljša kot pri kontroli. Najmanjši vpliv na hitrost zapiranja raze je imel PDGF-B (184 ng/ μ l).

Za natančnejše ovrednotenje vpliva posameznega rastnega dejavnika na hitrost zapiranja raze, smo na celice dodali rastne dejavnike v koncentraciji 35 ng/ μ l (z izjemo EGFL7, ki smo ga redčili desetkrat, saj nismo imeli testa ELISA, s katerim bi lahko določili njegovo koncentracijo). Iz slike 20 in 21 je razvidno, da rastni dejavniki pospešijo zapiranje raze v primerjavi s kontrolo tudi pri nižjih koncentracijah (35 ng/ μ l). Vidimo, da je izmed uporabljenih rastnih dejavnikov na hitrost zapiranja raze najbolj vplival FGF-2. To se sklada z rezultati Schreier in sod. (1993), ki so pokazali, da FGF-2 v primerjavi z drugimi rastnimi dejavniki (EGF, PDGF in TGF- β) vpliva predvsem na migracijo fibroblastov v pogojih *in vitro*, medtem ko ostali dejavniki v večji meri stimulirajo proliferacijo fibroblastov. V primerjavi s kontrolo so na hitrost zapiranja raze pozitivno vplivali tudi EGFL7, IGF-I in TGF- β 1. PDGF-B in VEGF-A v primerjavi s kontrolo nista bistveno vplivala na hitrost zapiranja raze, kar je pričakovano, saj zlasti VEGF-A vpliva na angiogenezo. Lee in sod. (2009) so ugotovili, da so rastni dejavniki v mediju, v katerem so rasle matične celice, prisotni v različnih koncentracijah ter da je koncentracija FGF-2 najnižja izmed vseh. Na podlagi tega bi lahko sklepali, da FGF-2 deluje pri nižjih koncentracijah, kot ostali rastni dejavniki.

Če primerjamo rezultate prikazane na slikah 18, 19, 20 in 22 vidimo, da višje koncentracije rastnih dejavnikov bolje vplivajo na hitrost zapiranja raze v pogojih *in vitro*. Da je hitrost zapiranja rane pospešena pri višjih koncentracijah rastnih dejavnikov v gojišču, so z redčenjem gojišča, v katerem so rasle matične celice, pokazali tudi Chen in sod. (2008),

Cordeiro in sod. (2000), Hu in sod. (2013) Kim in sod. (2007), Lee in sod. (2009) ter Yew in sod. (2011).

Za uporabo rastnih dejavnikov v terapevtske namene je ključnega pomena, da določimo najnižjo koncentracijo rastnega dejavnika, s katero dobimo maksimalen vpliv na celjenje. Visoke koncentracije rastnih dejavnikov v organizmu imajo lahko tudi negativne posledice, hkrati pa lahko inhibitorno vplivajo na samo celjenje (Hu sod., 2013). Ugotovili smo, da ima rastni dejavnik FGF-2 največji vpliv na hitrost zapiranja raze pri nizkih koncentracijah (slika 20 in 21). Zato smo za določitev območja v katerem rastni dejavnik še vedno pozitivno vpliva na zapiranja raze, rastni dejavnik FGF-2 razredčili do koncentracije 25 pg/ml. Iz slik 22 in 23 vidimo, da so vse uporabljene redčitve rastnega dejavnika FGF-2 v primerjavi s kontrolo pospešile zapiranje raze v pogojih *in vitro* ter da je aktivna koncentracija FGF lahko še bistveno nižja, kar je smisleno v nadaljnjih raziskavah eksperimentalno preveriti.

V okviru magistrske naloge smo pokazali, da dodajanje rastnih dejavnikov pozitivno vpliva na hitrost zapiranja raze v modelu celjenja rane *in vitro*. Vendar pa test hitrosti zapiranja raze slabo odraža fiziološke procese, ki se dogajajo med samim celjenjem. Za boljšo oceno delovanja rastnih dejavnikov v pogojih *in vivo*, bi rastne dejavnike morali testirati še na bolj kompleksnih modelih celjenje rane, kot na primer na organotipskih ali organskih modelih kože. Dejavnike, ki bi dali najboljše rezultate, pa bi testirali še na živalskih modelih celjenja kroničnih ran. Šele tako bi lahko izbrali potencialne rastne dejavnike za terapijo celjenja ran v primernih koncentracijah.

Terapije z uporabo matičnih celic, bi lahko imele tudi negativne učinke. Če bi bile koncentracije rastnih dejavnikov previsoke, bi lahko prišlo do nastaneka keloidnih ter hipertofičnih brazgotin. Dodajanje rastnih dejavnikov v visokih koncentracijah pa bi lahko sprožilo tudi formacijo tumorjev (Witsch in sod., 2010). Z redčenjem rastnih dejavnikov, bi lahko določili optimalne koncentracije za terapevtske namene in tako preprečili neželene učinke. Na ta način bi lahko koncentracije prilagajali glede na starost in spol pacientov ter vrsto njihovih poškodb (kronične ali akutne rane) in tako nudili optimalno terapijo.

Uporaba rastnih dejavnikov pa z medicinskega aspekta ni zanimiva le za izboljšanje celjenja ran. Z uporabo rastnih dejavnikov bi lahko izboljšali tudi nevroregeneracijo (Emerich in sod., 2014), celjenje kosti (Yun in sod., 2012), angiogenezo (Barrientos in sod., 2008) in druge regeneracijske procese. Obenem pa imajo rastni dejavniki velik potencial tudi v veterinarski medicini.

6 SKLEPI

- Uspešno smo pripravili genske konstrukte mišjih rastnih dejavnikov EGFL7, FGF-2, IGF-I, PDGF-B, TGF- β 1 in VEGF-A ter njihovo nukleotidno zaporedje potrdili s kontrolno restrikcijo in sekveniranjem
- Z uporabo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo smo pokazali, da v prehodno transficiranih celicah HEK293T pride do transkripcije transficiranih mišjih rastnih dejavnikov.
- Z western prenosom smo potrdili izražanje proteina EGFL7 v prehodno transficiranih celicah HEK293T in v stabilno transficiranih celicah NIH3T3.
- S testi ELISA smo potrdili in kvantificirali produkcijo rastnih dejavnikov FGF-2, IGF-I, PDGF-B, TGF- β 1 in VEGF-A v gojišču prehodno transficiranih celic HEK293T. Dobljeni rezultati kažejo, da celice HEK293T omenjene rastne dejavnike proizvajajo v visokih koncentracijah in jih izločajo v gojišče.
- Pokazali smo, da prehodno transficirane celice HEK293T rastne dejavnike proizvajajo in sproščajo v gojišče tudi, ko rastejo v odsotnosti serum.
- Pripravili smo s posameznim rastnim dejavnikom (FGF-2, IGF-I, PDGF-B, TGF- β 1 in VEGF-A) stabilno transficirane celice NIH3T3 in s testi ELISA pokazali, da celice v gojišče sproščajo rastne dejavnike v daljšem časovnem obdobju.
- Pokazali smo, da dodajanje gojišča, ki vsebuje posamezne rastne dejavnike (EGFL7, FGF-2, IGF-I, PDGF-B, TGF- β 1 in VEGF-A), pospeši zapiranje raze na modelu rane v pogojih *in vitro*.
- Ugotovili smo, da imajo različni rastni dejavniki različen vpliv na zapiranje rane, ter da je njihov vpliv odvisen tudi od njihove koncentracije. Pokazali smo, da pri visokih koncentracijah vsi uporabljeni rastni dejavniki pospešijo zapiranje raze. Pri dodajanju enake količine rastnih dejavnikov na raze (35 ng/ml) je imel največji vpliv na hitrost zapiranja raze FGF-2, ki so mu sledili EGFL7, IGF-I, PDGF-B in TGF- β 1. VEGF-A pri koncentraciji 35 ng/ml ni imel vpliva na hitrost zapiranja raze.
- Pokazali smo, da rastni dejavnik FGF-2 v primerjavi s kontrolo pozitivno vpliva na hitrost zapiranja raze v območju med 25 ng/ml in 25 pg/ml.

7 POVZETEK

Koža je pomemben organ, ki opravlja številne funkcije, obenem pa je najbolj izpostavljen organ, ki doživi veliko poškodb. Zaradi pomembne funkcije kože mora za ohranjanje normalne fiziologije organizma celjenje potekati nemoteno (Saladin, 2009).

Celjenje ran je dinamičen proces, pri katerem sodelujejo številne topne molekule in različne celice. Celjenje je sestavljeno iz štirih faz: hemostaze, faze vnetja, faze proliferacije in faze preoblikovanja tkiva, ki se med seboj časovno prekrivajo (Singer in Clark, 1999). Pri procesu celjenja rane imajo pomembno vlogo rastni dejavniki, ki preko vezave na specifične receptorje vplivajo na različne signalne poti v celicah. Pri celjenju ran imajo veliko vlogo predvsem rastni dejavniki iz družine epidermalnih rastnih dejavnikov, družine fibroblastnih rastnih dejavnikov, družine transformirajočih rastnih dejavnikov, družine rastnih dejavnikov iz trombocitov, družine vaskularno endotelijskih rastnih dejavnikov in inzulinu podobni rastni dejavnik 1 (Barrientos in sod., 2008).

V zdravstvu velike težave predstavljajo kronične rane, do katerih pride zaradi zakasnitve ene od faz prisotnih pri normalnem celjenju ran. Za kronične rane so značilne nizke koncentracije rastnih dejavnikov, kar še dodatno oteži celjenje (Maxson in sod., 2012; Crovetti, 2004). Kožne rane kljub dobremu poznavanju celičnega in molekularnega dogajanja med celjenjem, ostajajo velik zdravstveni problem, saj trenutno dostopne terapije niso dovolj učinkovite. Zato se pojavlja veliko alternativnih pristopov za izboljšanje celjenja ran. Velik potencial za uporabo v terapevtske namene kažejo matične celice in rastni dejavniki, ki jih izločajo (Jayaraman in sod., 2013).

Matične celice so nediferencirane celice, ki so se glede na njihovo plastičnost sposobne diferencirati v različne celične tipe (Saladin, 2009). Matične celice imajo vlogo pri vseh fazah zdravljenja rane (Maxson in sod., 2012). Znano je, da matične celice na celjenje ran vplivajo predvsem preko sproščanja različnih rastnih dejavnikov in citokinov. Zato se zdi terapevtska uporaba medija, v katerem so rasle matične celice, odlična alternativa terapijam z matičnimi celicami (Jayaraman in sod., 2013).

V okviru magistrske naloge smo z uporabo dostopne znanstvene literature izbrali nekaj rastnih dejavnikov, ki se izražajo v sesalskih celicah in imajo pozitiven vpliv na celjenje ran. Z uporabo molekularnih metod smo genske zapise za rastne dejavnike EGFL7, FGF-2, IGF-I, PDGF-B, TGF- β 1 in VEGF-A vnesli v plazmide s konstitutivnim promotorjem in pravilnost zaporedij potrdili s kontrolnimi restrikcijami in DNA sekveniranjem.

Plazmide z zapisi za rastne dejavnike smo vnesli v sesalske celice HEK293T. Z uporabo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo smo dokazali, da v sesalskih celicah HEK293T pride to transkripcije vnesenih genov za rastne dejavnike.

V okviru magistrske naloge smo pripravili tudi s posameznim rastnim dejavnikom stabilno transficirane celice NIH3T3. Z western prenosom smo pokazali, da prehodno transficirane celice HEK293T in stabilno transficirane celice NIH3T3 proizvajajo rastni dejavniki EGFL7. S komercialno dostopnimi encimskoimunskimi testi smo pokazali, da prehodno transficirane celice HEK293T in stabilno transficirane celice NIH3T3 izločajo rastne dejavnike v gojišče v visokih koncentracijah. Z uporabo testov ELISA smo pokazali, da smo uspešno pridobili stabilne linije NIH3T3 celic, ki so izločale rastne dejavnike v daljšem časovnem obdobju.

Za določitev vpliva posameznega rastnega dejavnika na hitrost migracije in proliferacije celic NIH3T3 smo izvedli test zapiranja raze. Na modelu zapiranja raze v pogojih *in vitro* smo pokazali, da imajo rastni dejavniki pozitiven vpliv na hitrost zapiranja raze v primerjavi s kontrolo. Iz rezultatov prikazanih v nalogi vidimo, da so višje koncentracije rastnih dejavnikov pospešile zapiranje raze v primerjavi z nižjimi koncentracijami. Rezultati kažejo tudi, da imajo različni rastni dejavniki različne vplive na hitrost zapiranja raze v pogojih *in vitro*. Največji vpliv pri nizkih koncentracijah pa ima rastni dejavnik FGF-2, ki tudi pri koncentraciji 25 pg/ml še vedno pozitivno vplival na zapiranje raze.

Ker pa je model raze zelo preprost model, ki slabo odraža fiziologijo celjenja ran, bi za natančnejšo določitev vplivov posameznih rastnih dejavnikov *in vivo* morali uporabiti kompleksnejše modele celjenja ran, kot na primer organotipske in organske modele kože, ter mišje modele.

Z določitvijo optimalne koncentracije rastnih dejavnikov, bi lahko količine prilagodili pacientom glede na spol, starost in vrsto poškodbe in tako še izboljšali terapije z uporabo rastnih dejavnikov. Rastni dejavniki pa z medicinskega stališča niso zanimivi le za izboljšanje celjenja ran, saj pozitivno vplivajo tudi na angiogenezo, celjenje kosti in nevroregeneracijo. Ravno zaradi mnogih potencialnih aplikacij bodo terapije z rastnimi dejavniki v prihodnosti najverjetneje vedno bolj aktualne.

8 VIRI

- Bao P., Kodra A., Tomic-Canic M., Golinko M. S., Ehrlich H. P., Brem H. 2009. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *The Journal of surgical research*, 153, 2: 347–538
- Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M. S., Brem H., Tomic-Canic M. 2008. Growth Factors and Cytokines in Wound Healing. *Wound repair and regeneration*, 16, 5: 585–601
- Bhang S. H, Sun A. J., Yang H. S., Rhim T., Kim D. I., Kim B. S. 2011. Skin Regeneration with Fibroblast Growth Factor 2 Released from Heparin-Conjugated Fibrin. *Biotechnology letters*, 33, 4: 845–851
- Braun S., Keller U., Beer H. D., Krampert M., Müller M., Werner S., Dickson C., Werner S. 2002. Meeting Report: Growth Factors in Development, Repair and Disease. *European journal of cell biology*, 81, 7: 375–382
- Brown, R. L., Breedon M. P., Greenhalgh D. G. 1994. PDGF and TGF-Alpha Act Synergistically to Improve Wound Healing in the Genetically Diabetic Mouse. *The Journal of surgical research*, 56, 6: 562–570
- Campagnolo L., Leahy A., Chitnis S., Koschnick S., Fitch M. J., Fallon J. T., Loskutoff D., Taubman M. B., Stuhlmann H. 2005. EGFL7 Is a Chemoattractant for Endothelial Cells and Is up-Regulated in Angiogenesis and Arterial Injury. *The American journal of pathology*, 167, 1: 275–284
- Cha J., Falanga V. 2007. Stem Cells in Cutaneous Wound Healing. *Clinics in dermatology*, 25, 1: 73–78
- Chen L., Tredget E. E., Wu P. Y. G., Wu Y. 2008. Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. *PloS one*, 3, 4: e1886, doi: 10.1371/journal.pone.0001886: 12 str.
- Chen M., Przyborowski M., Berthiaume F. 2009. Stem Cells for Skin Tissue Engineering and Wound Healing. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 37, 4-5: 399–421
- Clark R., Ghosh K., Tonnesen M. G. 2007. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. *The Journal of investigative dermatology*, 127, 5: 1018–1029

- Cordeiro M. F., Bhattacharya S. S., Schultz G. S., Khaw P. T. 2000. TGF- B1, - B 2, and B 3 In Vitro: Biphasic Effects on Tenon's Fibroblast Contraction, Proliferation, and Migration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 3: 756–763
- Emerich D. F., Orive G., Thanos C., Tornoe J., Wahlberg L. U. 2014. Encapsulated cell therapy for neurodegenerative diseases: From promise to product. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 67-68: 131-141
- Eming S. A., Krieg T., Davidson J. M. 2007. Gene Therapy and Wound Healing. *Clinical Dermatology*, 25, 1: 79–92
- Gruen L., Grabel L. 2006. Concise Review: Scientific and Ethical Roadblocks to Human Embryonic Stem Cell Therapy. *Stem cells*, 24, 10: 2162–2169
- Guo S., Dipietro L. 2010. Factors Affecting Wound Healing. *Journal of dental research*, 89, 3: 219–229
- Gurtner G. C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M. T. 2008. Wound Repair and Regeneration. *Nature*, 453, 7193: 314–321
- Herberts C., Kwa M. S. G., Hermsen H. P. H. 2011. Risk Factors in the Development of Stem Cell Therapy. *Journal of translational medicine*, 9: 29, doi: 10.1186/1479-5876-9-29: 14 str.
- Hocking A. M., Gibran N. S. 2010. Mesenchymal Stem Cells: Paracrine Signaling and Differentiation during Cutaneous Wound Repair. *Experimental cell research*, 316, 14: 2213–2219
- Hu L., Zhao J., Liu J., Gong N., Chen L. 2013. Effects of Adipose Stem Cell-Conditioned Medium on the Migration of Vascular Endothelial Cells, Fibroblasts and Keratinocytes. *Experimental and therapeutic medicine*, 5, 3: 701–706
- Ibrahim M. M. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity reviews*, 11, 1: 11–18
- Invitrogen, Life technologies. pcDNA3.
<http://www.molecularinfo.com/MTM/K/K2/K2-1/pcdna3.pdf> (november 2013)
- Jayaraman P., Nathan P., Vasanthan P., Musa S., Govindasamy V. 2013. Stem Cells Conditioned Medium: A New Approach to Skin Wound Healing Management. *Cell biology international*, 37, 10: 1122-1128

- Kim W. S., Park B. S., Sung J. H., Yang J. M., Park S. B., Kwak S. J., Park J.S. 2007. Wound Healing Effect of Adipose-Derived Stem Cells: A Critical Role of Secretory Factors on Human Dermal Fibroblasts. *Journal of dermatological science*, 48, 1: 15–24
- Kottakis F., Polytarchou C., Foltopoulou P., Sanidas I., Kampranis S. C., Tsichlis P. N. 2011. FGF-2 Regulates Cell Proliferation, Migration and Angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 Pathway. *Molecular Cell*, 43, 2: 285–298
- Lau K., Paus R., Tiede S., Day P., Bayat A. 2009. Exploring the Role of Stem Cells in Cutaneous Wound Healing. *Experimental dermatology*, 18, 11: 921–933
- Lee E. Y., Xia Y., Kim W. S., Kim M. H., Kim T. H., Kim K. J., Park B. S., Sung J. H. 2009. Hypoxia-Enhanced Wound-Healing Function of Adipose-Derived Stem Cells: Increase in Stem Cell Proliferation and up-Regulation of VEGF and bFGF. *Wound repair and regeneration*, 17, 4: 540–547
- Lee M. J., Kim J., Lee K. I., Shin J. M., Chae J. I., Chung H. M. 2011. Enhancement of Wound Healing by Secretory Factors of Endothelial Precursor Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Cyotherapy*, 13, 2: 165–178
- Leonardi D., Oberdoerfer D., Fernandes M. C., Meurer R. T., Pereira-filho G. A., Cruz P., Vargas M., Chem R. C., Camassola M., Nardi N. B. 2012. Mesenchymal Stem Cells Combined with an Artificial Dermal Substitute Improve Repair in Full-Thickness Skin Wounds. *Burns*, 38, 8: 1143–1150
- Liang C. C., Park A. Y., Guan J. L. 2007. In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration in Vitro. *Nature protocols*, 2, 2: 329–333
- Makridakis M., Roubelakis M. G., Vlahou A. 2013. Stem Cells: Insights into the Secretome. *Biochimica et biophysica acta*, 1834, 11: 2380–2384
- Martin P. 1997. Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science*, 276, 5309: 75–81
- Maxson S., Lopez E., Yoo D., Danilkovitch-Miagkova A., Leroux M. 2012. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem cells translational medicine*, 1, 2: 142–149
- McFarlin K., Gao X., Liu Y. B., Dulchavsky D. S., Kwon D., Arbab A. S., Bansal M., Li Y., Chopp M., Dulchavsky S., Gautam S. C. 2006. Bone Marrow-Derived Mesenchymal

- Stromal Cells Accelerate Wound Healing in the Rat. *Wound repair and regeneration*, 14, 4: 471–478
- Mountford J. C. 2008. Human Embryonic Stem Cells: Origins, Characteristics and Potential for Regenerative Therapy. *Transfusion medicine*, 18, 1: 1–12
- Nakagawa H., Akita S., Fukui M., Fujii T., Akino K. 2005. Human Mesenchymal Stem Cells Successfully Improve Skin-Substitute Wound Healing. *The British journal of dermatology*, 153, 1: 29–36
- Ono I., Gunji H., Zhangb J. Z., Maruyamab K., Kaneko F. 1995. Studies on cytokines related to wound healing in donor site wound fluid. *Journal of Dermatological Science*, 10: 241-245
- Peng L. H., Tsang S. Y., Tabata Y., Gao J. Q. 2012. Genetically-Manipulated Adult Stem Cells as Therapeutic Agents and Gene Delivery Vehicle for Wound Repair and Regeneration. *Journal of controlled release*, 157, 3: 321–330
- Posnett J., Gottrup F., Lundgren H., Saal G. 2009. The Resource Impact of Wounds on Health-Care Providers in Europe. *Journal of Wound Care*, 18, 4: 154-161
- Robinton, D. A., George D. Q. 2012 The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481, 7381: 295-305
- Saladin K. S. 2009. *Anatomy and Physiology: The Unity of Form and Function*. 5th ed. New York, McGraw Hill Higher Education: 1248 str.
- Schmidt M., Paes K., De Mazière A., Smyczek T., Yang S., Gray A., French D., Kasman I., Klumperman J., Rice D. S., Ye W. 2007. EGFL7 Regulates the Collective Migration of Endothelial Cells by Restricting Their Spatial Distribution. *Development*, 134, 16: 2913–2923
- Schreier T., Degen E., Baschong W. 1993. Fibroblast Migration and Proliferation during *in Vitro* Wound Healing. *Research in experimental medicine*, 193:195–205
- Schultz G. S, Gibson D. J. 2012. Measurement of Biomarkers for Impaired Healing in Fluids and Tissues V: Measurements in Wound Healing: Science and Practice. Mani R., Romanelli M., Shukla V. (eds.). London, Springer-Verlag: 243-258
- Singer A. J., Clark R. A. F. 1999. Cutaneous Wound Healing. *The New England Journal of Medicine*, 341, 10: 738 – 746

Todorović V., Pesko P., Micev M., Bjelović M., Budec M., Mićić M., Brasanac D., Ilić-Stojanović O. 2008. Insulin-like Growth Factor-I in Wound Healing of Rat Skin. *Regulatory peptides*, 150, 1-3: 7–13

Walter M. N., Wright K. T., Fuller H. R., MacNeil S., Johnson W. E. 2010. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Accelerates Skin Wound Healing: An in Vitro Study of Fibroblast and Keratinocyte Scratch Assays. *Experimental cell research*, 316, 7: 1271–1281

Watt F. M., Driskell R. R. 2010. The Therapeutic Potential of Stem Cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365, 1537: 155–163

Werner S., Grose R. 2003. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiological reviews*, 83, 3: 835–870

Witsch E., Sela M., Yarden Y. 2010. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology*, 25, 2: 85-101

Yang H. S., Shin J., Bhang S. H., Shin J. Y., Park J., Im G. I., Kim C. S., Kim B. S. 2011. Enhanced Skin Wound Healing by a Sustained Release of Growth Factors Contained in Platelet-Rich Plasma. *Experimental & molecular medicine*, 43, 11: 622–629

Yew T.L., Hung Y. T., Li H. Y., Chen H. W., Huang T. F., Chen H. I., Hung S. C. 2011. Enhancement of Wound Healing by Human Multipotent Stromal Cell Conditioned Medium : The Paracrine Factors and p38 MAPK Activation. *Cell Transplantation*, 20: 693–706

Yu F. S. X., Yin J., Xu K., Huang J. 2010. Growth Factors and Corneal Epithelial Wound Healing. *Brain research bulletin*, 81, 2-3: 229–235

Yun Y. R., Jang J. H., Jeon E., Kang W., Lee S., Won J. E., Kim H. W., Wall I. 2012. Administration of growth factors for bone regeneration. *Regenerative Medicine*, 7, 3: 369-385

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Simonu Horvatu za prevzem mentorstva in za pomoč tekom dela. Zahvaljujem se mu tudi za nasvete pri pisanju ter za hiter in natančen pregled naloge.

Dr. Ivi Hafner Bratkovič se zahvaljujem za vso pomoč pri laboratorijskem delu, za številne nasvete ter vzpodbudo. Zahvaljujem se ji tudi za pomoč pri pisanju in oblikovanju naloge, ter za temeljit pregled naloge.

Zahvaljujem se prof. dr. Romanu Jerali, ki mi je omogočil delo na Kemijskem inštitutu. Hvala za vse nasvete in ideje ter pregled naloge.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Gregorju Anderluhu za pregled naloge.

Vsem sodelovcem se zahvaljujem za prijaznost, pomoč in dobro delovno vzdušje. Posebej se zahvaljujem cimrom Anji, Dušku, Tini F., Janu, Nini in Vidu za pomoč pri reševanju najrazličnejših težav, za vso dobro voljo ter vzpodbudo.

Posebna zahvala gre tudi mojim domačim in Mihu za potrpljenje, vzpodbudo in podporo.