

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ana KARNIČNIK

**VPLIV LIZATA TROMBOCITOV NA RAST IN DIFERENCIACIJO HUMANIH
HONDROCITOV *IN VITRO***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**THE EFFECT OF HUMAN PLATELET LYSATE *IN VITRO* ON GROWTH AND
DIFFERENTIATION OF HUMAN CHONDROCYTES**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija -2. stopnja Biotehnologija.
Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v podjetju Educell d.o.o.

Po sklepu komisije 1. in 2. stopnje študija Biotehnologije iz dne, 07.02.2014, je bil za mentorja predlagan doc. dr. Miomirja Kneževića, za somentorja dr. Ariano Barlič in za recenzenta izr. prof. dr. Matjaža Jerasa.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: doc. dr. Miomir Knežević,
Educell d.o.o., Ljubljana

Član: dr. Ariana Barlič,
Educell d.o.o., Ljubljana

Član: izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Datum zagovora:

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

Ana Karničnik

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

ŠD Du2

DK UDK 576: 617.3 (043.2) = 163

KG LysexTM Premium/ hondrocyti/trombociti/lizati/hrustanec/gensko izražanje/celične kulture/*in vitro*/tkivno inženirstvo/

AV KARNIČNIK, Ana, dipl. bioteh.(UN)

SA KNEŽEVIČ, Miomir (mentor)/BARLIČ, Ariana (somentor)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, študij Biotehnologije

LI 2014

IN VPLIV LIZATA TROMBOCITOV NA RAST IN DIFERENCIACIJO HUMANIH HONDROCITOV *IN VITRO*

TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)

OP XII, 61 str., 47 sl., 3 pril., 42 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI V magistrski nalogi smo želeli ugotoviti vpliv lizata trombocitov *LysexTM Premium* na rast in diferenciacijo hondrocytov elastičnega in sklepnegga (hialinega) hrustanca v enoslojni kulturi gojeni *in vitro*. Lizat trombocitov predstavlja dober nadomestek za človeški in fetalni goveji serum (FBS) pri pripravljanju izdelkov za celične terapije. Poskus smo opravili na treh bioloških vzorcih hondrocytov iz elastičnega in treh bioloških vzorcih hondrocytov iz sklepnegga hrustanca. Hondrocyte smo odtalili in jih v enaki gostoti naselili v 4 različne medije. Prvi je vseboval človeški alogenski serum, drugi FBS, tretji in četrti pa različne koncentracije lizata trombocitov *LysexTM Premium*. Ko smo dosegli 80-90 % konfluenco v mediju 3 (*LysexTM Premium*), smo celice prešteli in naselili na novo gojilno ploščo. Enako smo storili s preostalimi celicami v medijih 1 (človeški alogenski serum), 2 (FBS) in 4 (*LysexTM Premium*). Postopek smo ponavljali vse do tretje pasaže. Celično rast in morfologijo smo spremljali s pomočjo invertnega svetlobnega mikroskopa. Pri obeh vrstah hondrocytov smo analizirali izražanje genov z metodo verižne reakcije pomnoževanja v realnem času (RT-QPCR). Preverjali smo izražanje genov specifičnih za hondrocyte elastičnega (ELN, ACAN, COL I, COL II, SOX9) in tistih značilnih za hondrocyte hialinega hrustanca (VCAN, ACAN, COL I, COL II, SOX9). Morfologija obeh vrst preiskovanih hondrocytov se med gojenjem v enoslojnih kulturah v mediju z dodatkom lizata trombocitov *LysexTM Premium* ni bistveno spremenila. Tekom vseh treh pasaž so celice obeh vrst v lizatu trombocitov *LysexTM Premium* obdržale podolgovato fibroblastom podobno obliko. Hondrocyti iz elastičnega in sklepnegga hrustanca so v mediju z lizatom trombocitov *LysexTM Premium* rastli veliko hitreje kot v medijih s človeškim serumom ali FBS. Izražanje specifičnih genov v mediju z dodatkom lizata trombocitov *LysexTM Premium* kaže na dodatno dediferenciacijo celic, zaradi pospešene proliferacije. Predvidevamo, da bi se obema vrstama hondrocytov z gojenjem v 3D okolju povrnil hrustančni fenotip (rediferenciacija), kar bo potrebno v prihodnosti potrditi z različnimi analizami.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDC 576: 617. 3 (043.2) = 163.6

CX LysexTM Premium/chondrocytes/platelets/lysates/cartilage/gene expression/cell culture/*in vitro*/tissue engineering/

AU KARNIČNIK, Ana

AA KNEŽEVIČ, Miomir (supervisor)/BARLIČ, Ariana (co-advisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

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

PY 2014

TI THE EFFECT OF HUMAN PLATELET LYSATE ON GROWTH AND DIFFERENTIATION OF HUMAN CHONDROCYTES *IN VITRO*

DT M. Sc. Thesis

NO XII, 61 p., 47 fig., 3 ann., 42 ref.

LA sl

AL sl/en

AB In this master thesis we determined the effect of LysexTM Premium platelet lysate on growth and differentiation of chondrocytes from elastic and hyaline cartilage cultured in monolayer cultures *in vitro*. Platelet lysate is an effective substitute for human and fetal bovine serum (FBS) in preparation of products for cell therapies. The experiments were conducted on three biological samples of chondrocytes from elastic and three biological samples of chondrocytes from hyaline cartilage. Both types of cells were cultured at the same plating density in 4 different media. The first one contained allogeneic human serum, the second FBS, while the third and the fourth one were prepared with various concentrations of LysexTM Premium platelet lysate. When the confluence of cells in the medium 3 (LysexTM Premium lysate) was almost 80-90 %, they were detached by trypsin, counted and seeded in a new culture vessel. The same procedure was performed with the remaining cells in the media 1 (human allogeneic serum), 2 (FBS) and 4 (LysexTM Premium lysate). This process was repeated up to the third passage. Cell growth and morphology were monitored under the inverted microscope. Gene expression in both types of hondrocytes were analyzed by the quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) method. The expression of genes specific for chondrocytes from elastic (ELN, ACAN, COL I, COL II, SOX9) and those characteristic of chondrocytes from hyaline cartilage (VCAN, ACAN, COL I, COL II, SOX9) were analysed. Morphology of chondrocytes from elastic and hyaline cartilage has not changed significantly during this cultivation in monolayers in a medium containing LysexTM Premium of platelet lysate. During all three passages both types of chondrocytes in LysexTM Premium the presence of the platelet lysate maintained an elongated fibroblast-like shape. Both types of cells growing in medium with LysexTM Premium platelet lysate grew much faster than in a human serum or FBS containing medium. Expression of specific genes in the presence of LysexTM Premium platelet lysate indicated additional chondrocytes dedifferentiation due to their stimulated proliferation. We assume that the hondrocytes from elastic and hyaline cartilage cultivated in 3D gel environment could restore their full cartilage phenotype (redifferentiation). However, this assumption still has to be confirmed in future by different analyses.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PRILOG.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
SLOVARČEK	XII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	3
2 PREGLED OBJAV.....	4
2.1 HRUSTANEC	4
2.1.1 Hrustanec splošno	4
2.1.2 Hondrocyti.....	4
2.1.2.1 Hondrocyti gojeni <i>in vitro</i>	5
2.1.2.2 Terapevtska uporaba gojenih hondrocytov	6
2.2 LIZAT TROMBOCITOV	7
2.2.1 Lizat človeških trombocitov LYSEX™ Premium	8
2.2.1.1 Opis	9
2.3 VERIŽNA REAKCIJA POMNOŽEVANJA V REALNEM ČASU (RT-QPCR) ...	10
2.3.1 Princip metode RT-qPCR	10
3 MATERIAL IN METODE	12
3.1 POTEK POSKUSOV	12
3.2 UPORABLJENE KEMIKALIJE, POTROŠNI MATERIAL IN LABORATORIJSKA OPREMA	13
3.2.1 Kemikalije.....	13
3.2.2 Drobni laboratorijski material	13
3.2.3 Laboratorijska oprema	14
3.3 PRIPRAVA MEDIJEV.....	14
3.3.1 Medij 1 (M1).....	15
3.3.2 Medij 2 (M2).....	15
3.3.3 Medij 3 (M3).....	16
3.3.4 Medij 4 (M4).....	16
3.4 GOJENJE CELIC <i>IN VITRO</i>	17
3.4.1 Odmrzovanje vzorca celic	17
3.4.2 Priprava hondrocytov od prve (P1) do tretje pasaže (P3)	17
3.4.3 Rast celic in tripsinizacija gojenih hondrocytov	18

3.4.4 Dohranjevanje hondrocytnih kultur	19
3.4.5 Zamrzovanje celic	19
3.4.6 Štetje celic s hemocitometrom.....	19
3.5 PRIPRAVA CELIC ZA ANALIZO IZRAŽANJA GENOV	20
 3.5.1 Izolacija celokupne RNA	20
 3.5.2 Merjenje koncentracije RNA.....	20
3.6 REVERZNA TRANSKRIPCIJA-PREPIS RNA V cDNA.....	21
3.7 VERIŽNA REAKCIJA POMNOŽEVANJA V REALNEM ČASU (RT-QPCR)...	21
4 REZULTATI.....	24
4.1 ELASTIČNI HRUSTANEC.....	24
 4.1.1 Morfologija in rast celic	24
 4.1.2 Izražanje genov hondrocytov iz elastičnega hrustanca, gojenih <i>in vitro</i>	32
4.2 SKLEPNI (HIALINI) HRUSTANEC.....	39
 4.2.1 Celična morfologija in rast celic	39
 4.2.2 Izražanje genov v hondrocytih iz sklepnega (hialinega) hrustanca, gojenih <i>in vitro</i>.....	47
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	53
5.1 MORFOLOGIJA IN RAST CELIC.....	53
5.2 IZRAŽANJE GENOV	53
5.3 SKLEPI.....	56
6 POVZETEK	57
7 VIRI.....	58
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz različnih faz hondrogeneze (Naranda in Vogrin, 2013: 689).....	5
Slika 2: Morfologija hondrocytov v kulturi <i>in vitro</i>	6
Slika 3: Različne stopnje v procesu implantacije avtolognih hondrocytov (Naranda in Vogrin, 2013: 690).....	7
Slika 4: <i>LysexaTM Premium</i> , proizvod Sclavo Diagnostics International (Italija).....	9
Slika 5: Potek dela.....	12
Slika 6: Gojilna plošča z 12 vdolbinami za gojenje celic in pripravljena gojišča.....	18
Slika 7: Hondrocyti iz elastičnega hrustanca v prvi pasaži (P1) pod 100x povečavo (vzorec PB)	24
Slika 8: Konfluentni hondrocyti iz elastičnega hrustanca prve pasaže (P1), tik pred tripsinizacijo.....	26
Slika 9: Konfluentni hondrocyti iz elastičnega hrustanca druge pasaže (P2), tik pred tripsinizacijo.....	27
Slika 10: Konfluentni hondrocyti iz elastičnega hrustanca tretje pasaže (P3), tik pred tripsinizacijo.....	28
Slika 11: Povprečne vrednosti števila hondrocytov iz elastičnega hrustanca v posameznem mediju, v vseh treh vzorcih (PB, KL, NN) iz prve pasaže (P1).....	29
Slika 12: Povprečne vrednosti števila hondrocytov iz elastičnega hrustanca v posameznem mediju, v vseh treh vzorcih (PB, KL, NN) iz druge pasaže (P2).....	29
Slika 13: Povprečne vrednosti števila hondrocytov iz elastičnega hrustanca v posameznem mediju, v vseh treh vzorcih (PB, KL, NN) iz tretje pasaže (P3).....	30
Slika 14: Kumulativno populacijsko podvajanje (KPD) hondrocytov iz elastičnega hrustanca v treh pasažah (P1, P2, P3) vzorca PB.....	31
Slika 15: Kumulativno populacijsko podvajanje (KPD) hondrocytov iz elastičnega hrustanca v treh pasažah (P1, P2, P3) vzorca KL	31
Slika 16: Kumulativno populacijsko podvajanje hondrocytov (KPD) iz elastičnega hrustanca v treh pasažah (P1, P2, P3) vzorca NN.....	32
Slika 17: Standardna krivulja za gen b2M vzorca NN, gojenega v prvi pasaži v mediju M1	33
Slika 18: Standardna krivulja za gen b2M vzorca NN, gojenega v prvi pasaži v mediju M3	33
Slika 19: Standardna krivulja za gen elastina vzorca NN, gojenega v prvi pasaži v mediju M1	33
Slika 20: Standardna krivulja za gen elastina vzorca NN, gojenega v prvi pasaži v mediju M3	34
Slika 21:Izražanje agrekana v hondrocytih iz elastičnega hrustanca, po prvi pasaži (P1), gojenih <i>in vitro</i>	35

Slika 22: Izražanje agrekana v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih <i>in vitro</i>	35
Slika 23: Izražanje kolagena tipa I v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po prvi pasaži (P1), gojenih <i>in vitro</i>	36
Slika 24: Izražanje kolagena tipa I v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih <i>in vitro</i>	36
Slika 25: Izražanje kolagena tipa II v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po prvi pasaži (P1), gojenih <i>in vitro</i>	37
Slika 26: Izražanje SOX9 v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po prvi pasaži (P1), gojenih <i>in vitro</i>	37
Slika 27: Izražanje SOX9 v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih <i>in vitro</i>	38
Slika 28: Izražanje elastina v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po prvi pasaži (P1), gojenih <i>in vitro</i>	38
Slika 29: Izražanje elastina v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih <i>in vitro</i>	39
Slika 30: Hondrocyti iz sklepnega hrustanca v prvi pasaži (P1), pod 100x (D1-D4) in 200x povečavo (d1-d4)	40
Slika 31: Konfluentna enoslojna kultura hondrocytov iz sklepnega hrustanca prve pasaže (P1) pod 100x povečavo	41
Slika 32: Konfluentna enoslojna kultura hondrocytov iz sklepnega hrustanca druge pasaže (P2) pod 100x povečavo	42
Slika 33: Konfluentna enoslojna kultura hondrocytov iz sklepnega hrustanca tretje pasaže (P3) pod 100x povečavo	43
Slika 34: Povprečne vrednosti števila hondrocytov iz sklepnega hrustanca v vseh treh vzorcih (TP, BU, FM) prve pasaže (P1), gojeni v posameznem mediju	44
Slika 35: Povprečne vrednosti števila hondrocytov iz sklepnega hrustanca v vseh treh (TP, BU, FM) vzorcih druge pasaže (P2), gojeni v posameznem mediju	44
Slika 36: Povprečne vrednosti števila hondrocytov iz sklepnega hrustanca v vseh treh vzorcih (TP, BU, FM) tretje pasaže (P3), gojeni v posameznem mediju	45
Slika 37: Kumulativno populacijsko podvajanje (KPD) hondrocytov iz sklepnega hrustanca v vseh treh pasažah (P1, P2, P3) vzorca TP	46
Slika 38: Kumulativno populacijsko podvajanje (KPD) hondrocytov iz sklepnega hrustanca v vseh treh pasažah (P1, P2, P3) vzorca BU.....	46
Slika 39 Kumulativno populacijsko podvajanje (KPD) hondrocytov iz sklepnega hrustanca v vseh treh pasažah (P1, P2, P3) vzorca FM	47
Slika 40: Izražanje agrekana v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po prvi pasaži (P1), gojenih <i>in vitro</i>	49
Slika 41: Izražanje agrekana v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih <i>in vitro</i>	49

Slika 42: Izražanje kolagena tipa I v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po prvi pasaži (P1) <i>in vitro</i>	50
Slika 43: Izražanje kolagena tipa I v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih <i>in vitro</i>	50
Slika 44: Izražanje SOX9 v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po prvi pasaži (P1), gojenih <i>in vitro</i>	51
Slika 45: Izražanje SOX9 v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih <i>in vitro</i>	51
Slika 46: Izražanje verzikana v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po prvi pasaži (P1), gojenih <i>in vitro</i>	52
Slika 47: Izražanje verzikana v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih <i>in vitro</i>	52

KAZALO PRILOG

Priloga A: Podatki za umeritveno krivuljo za gena b2M in ELN

Priloga B: Vrednosti $\text{Log}_2(\text{RQ})$ za elastični hrustanec, umerjene na M1 (človeški serum)

Priloga C: Vrednosti $\text{Log}_2(\text{RQ})$ za sklepni (hialini) hrustanec, umerjene na M1 (človeški serum)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACI	vsaditev avtolognih hondrocytov; angl. Autologous chondrocyte implantation
BMP	protein kostne morfogeneze
cDNA	komplementarna DNA, ki nastane z obratno transkripcijo iz mRNA
Ct	mejni cikel pri RT-qPCR
DEPC	dietilpirokarbonat
D-MEM	Dulbeccova modifikacija Eaglovega medija
DMSO	dimetilsulfoksid
dCTP	deoksicitozin-trifosfat
dGTP	deoksigvanin-trifosfat
dNTP	deoksiribonukleotid-trifosfat
dTTP	deoksitimin-trifosfat
EGF	epidermalni rastni dejavnik
ECM	izvencelični matriks; angl. Extracellular matrix
FBS	fetalni goveji serum; angl. Fetal bovine serum
FGF-2/bFGF	fibroblastni rastni dejavnik
<i>g</i>	enota pospeška pri centrifugiranju, težni pospešek
HGF	hepatocitni rastni dejavnik
hS	človeški serum
IGF	inzulinu podoben rastni dejavnik
KME	komisija za medicinsko etiko
MSC	mezenhimska matična celica
PDGF	trombocitni rastni dejavnik
PBS	fosfatni pufer z NaCl
PL	lizat trombocitov; Engl. Platelet Lysat
PPP	komponenta PL, pridobljena iz človeške plazme z malo trombociti; angl. Platelet Poor Plasma
PRP	komponenta PL, pridobljena iz človeške plazme bogate s trombociti; angl. Platelet Rich Plasma
RT-QPCR	verižna reakcija pomnoževanja v realnem času; angl. Reverse transcription quantitative PCR
TGF-β	transformirajoči rastni dejavnik β
VEGF	vaskularno-endotelijski rastni dejavnik
VUR	vezikoureteralni refluks

SLOVARČEK (povzeto po Tissue ..., 2014; Genetics ..., 2014; Rožman in Jež, 2009)

agrekan	poglavitni proteoglikan sklepnega (hialinega) hrustančnega tkiva
implantacija avtolognih hondrocytov	postopek zdravljenja poškodb sklepnega (hialinega) hrustanca bolnika z njemu lastnimi hrustančnimi celicami, gojenimi <i>in vitro</i>
enoslojna kultura	metoda gojenja celic v gojilnih posodah s sposobnostjo njihove pritrditve na rastno podlago v celičnih kulturah
fenotip	lastnosti organizma, ki so določene z zapisi v genomu in okoljskimi dejavniki, med razvojem organizma oz. strukturne in funkcijalne lastnosti organizma, ki jih lahko opažamo
hondrocyt	osnova celica hrustančnega tkiva
hrustanec	specifična oblika tkiva, sestavljena iz hondrocytov in obilnega izvenceličnega matriksa
elastin	poglavitna sestavina izvenceličnega matriksa elastičnega hrustančnega tkiva
kolagen	poglavitna proteinska struktorna enota izvenceličnega matriksa
konfluenca	pojav, ko celice v enoslojni kulturi prerastejo dno gojilne posode in so v tesnem stiku ena z drugo
lizat trombocitov	pripravek razpadlih trombocitov
morfološke razlike	preučevanje razlik glede na videz: oblika, velikost, organizacija
reverzna transkripcija	postopek prepisa RNA v cDNA s pomočjo encima reverzna transkriptaza
tkivno inženirstvo	izdelani pripravki iz zdravih celic in nosilca <i>in vitro</i> s katerim poskušamo nadomestiti poškodovano tkivo
transkripcijski dejavnik	beljakovina, ki je potrebna za začetek prepisovanja DNA
tripsinizacija	postopek odlepljanja celic v enoslojni kulturi z dna gojilne posode s pomočjo tripsina
3D kultura	metoda gojenja evkariontskih celic v različnih nosilnih strukturah, ki omogočajo njihovo rast v vseh treh prostorskih dimenzijah
vezikan	Poglavitna sestavina izvenceličnega matriksa vezivnega hrustančnega tkiva

1 UVOD

Tkivno inženirstvo postaja vedno pomembnejši del regenerativne medicine, saj uporablja načela bioloških in inženirskih znanosti za razvoj živih tkivnih in organskih nadomestkov. Terapevtski izdelki tkivnega inženirstva omogočajo obnovitev, vzdrževanje in izboljšanje funkcij poškodovanega ali okvarjenega tkiva. Eden izmed prvih pristopov na tem področju je bilo zdravljenje poškodb sklepne hrustanca. Tehnike tkivnega inženirstva pa se vedno bolj uveljavljajo tudi v regenerativni medicini sečil (Dragin Jerman in Erdani Kreft, 2012; Tkivno ..., 2014).

Osnovi namen prizadevanj zdravljenja hrustančnih okvar je nadomestiti poškodovano ali bolezensko spremenjeno hrustančno tkivo z lastnim trajnim živim tkivom in tako zmanjšati bolezenske simptome v sklepu ter preprečiti predčasno degeneracijo preostalega hrustanca. Sklepni hrustanec ima zaradi specifične zgradbe omejeno sposobnost celjenja po poškodbah in boleznih. Hondrocyti sicer izdelujejo medceličnino vse življenje, vendar to ne zadošča za ustrezno popravilo tkiva po poškodbi. Največjo omejitev za regeneracijo poškodbe predstavlja: razpoložljivost hrustančnega tkiva primerrega za presaditev, velikost poškodbe, difuzne degenerativne spremembe v sklepu in starost bolnika. Zdravljene hrustančnih okvar z metodo vsaditve avtolognih hondrocytov (ACI), predhodno namnoženih v kulturi, je pripeljalo do dobrih kliničnih rezultatov. ACI je metoda, pri kateri iz kolena bolnika artroskopsko odvzamejo koščke zdravega hrustanca (200-250 mg) z roba neobremenjene sklepne površine. Iz njih izolirajo hrustančne celice, jih gojijo in nato vrnejo v sklep na mesto poškodbe. Ta postopek daje spodbudne rezultate pri zdravljenju lokaliziranih okvar sklepne hrustanca mlajših ljudi, medtem ko za razširjeno prizadetost tega tkiva pri degenerativnih boleznih trenutno še nimamo ustrezne rešitve. V kulturi vzgojene hondrocyte so že leta 1996 pričeli uporabljati na Ortopedski kliniki v Ljubljani (Radosavljevič in sod., 2003). Do sedaj je bilo z metodo ACI zdravljenih že skoraj 300 pacientov (Tkivno ..., 2014).

Inovativni izdelek tkivnega inženirstva, ki ga poleg pripravka ACI pripravlja v podjetju Educell d.o.o. je tudi avtologni celični produkt pripravljen iz hondrocytov izoliranih iz ušesnega hrustanca za zdravljenje vezikoureteralnega refluksa (VUR). VUR je zatekanje seča iz mehurja nazaj v ledvico, ki nastane zaradi oslabljenega vezikoureteralnega ustja. Povzroča kronično vnetje in okvaro ledvic. Metoda je osnovana na bolnikovih lastnih celicah, ki jih pridobimo iz biopta ušesnega hrustanca. S to metodo dosegamo boljše in trajnejše rezultate kot z injeciranjem kolagena pod sluznico vezikoureteralnega ustja, saj se kolagen sčasoma razgradi in je potreben ponovni poseg. Vsajene hrustančne celice stalno izločajo medceličnino, bogato s kolageni. Avtologni izvor celic in uporabljeni plazme pa izključujejo tudi možnost zavrnitve vsadka. Do sedaj so na ta način zdravili 18 bolnikov (Tkivno ..., 2014).

Raziskovalni del magistrske naloge smo izvedli v laboratoriju podjetja Educell d.o.o., kjer gojijo hrustančne celice za avtologno uporabo za obe omenjeni indikaciji. Novembra 2008 je Educell dobil status Ustanove za tkiva in celice, takrat kot prva organizacija na tem področju v Sloveniji (Tkivno ..., 2014).

1.1 NAMEN NALOGE

Pri gojenju človeških celic *ex vivo / in vitro* je potrebno gojišču dodajati različne rastne dejavnike in druge proteine, ki omogočajo celicam pritrditev na rastno površino v gojilni posodi, njihovo rast in razmnoževanje. V ta namen se kot dodatek gojišču običajno uporablja serum pridobljen iz govejih zarodkov (fetal bovine serum - FBS), lahko pa tudi alogenski ali avtologni človeški serum. Za gojenje celic za klinično uporabo, t.j. celične terapije iščejo nadomestke za serum, ki bi celicam zagotavljali vse potrebno za rast in razmnoževanje. Uporaba FBS pri pripravljanju izdelkov za celične terapije je potencialno nevarna predvsem zaradi možnosti prenosa ksenogenih antigenov in prenosa raznih zoonoznih okužb. Najprimernejša je torej uporaba človeškega avtognega seruma, vendar pa je njegovo pridobivanje lahko otežkočeno zaradi bolezenskega stanja pacienta ter same logistike priprave in transporta. Primerna bi bila tudi uporaba alogenskega seruma, a je v tem primeru težko zagotoviti konsistentnost tovrstnih pripravkov, namenjenih za gojenje celic različnih bolnikov. Obstaja torej potreba po definiranih in konsistentnih serumskih nadomestkih, zato se nenehno iščejo ustrezeni nadomestki. Eden izmed njih bi lahko bil lizat trombocitov, ki vsebuje široko paletto rastnih dejavnikov, potrebnih za rast celic. Pripravljajo ga iz velikega števila vzorcev krvi, s čimer lahko zagotovijo konsistentnost vsebnosti aktivnih molekul v pripravku.

V nalogi smo želeli:

- Primerjati vplive fetalnega govejega seruma, človeškega alogenskega seruma in lizata trombocitov na rast in fenotipske lastnosti hondrocytov iz elastičnega hrustanca.
- Primerjati vplive fetalnega govejega seruma, človeškega alogenskega seruma in lizata trombocitov na rast in fenotipske lastnosti hondrocytov iz sklepnega hrustanca.
- Ovrednotiti komercialno dostopni lizat trombocitov v smislu ustreznosti njegove uporabe za nadomeščanja seruma pri gojenju celic.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predpostavljamo, da bo lizat trombocitov uspešno stimuliral rast hondrocytov iz elastičnega in sklepnega hrustanca v enoslojni kulturi *in vitro*.

Predpostavljamo tudi, da bo lizat trombocitov zaradi visoke vsebnosti številnih rastnih dejavnikov, predvsem TGF- β , bolje vzdrževal hondrocytni fenotip celic v enoslojni kulturi.

Predpostavljamo, da bodo rezultati magistrske naloge uporabni pri razvoju novih celičnih izdelkov, namenjenih klinični uporabi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HRUSTANEC

2.1.1 Hrustanec splošno

Hrustanec je tkivo z veliko vsebnostjo vode (približno 80 %), preostanek pa sestavlja izvencelični matriks (extracellular matriks; ECM) in hondrocyti, celice, ki izločajo medceličnino. V izvencelični matriks so vgrajena kolagenska ali elastična vlakna. Celice se nahajajo v majhnih prostorih, lakunah, obdanih z medceličnino. Hrustanec je ovit v pohrustančico iz fibrilarnega veziva, ki je dobro prekrvljena. Hrustanec sam ne vsebuje krvnih žil, živcev in limfnih žlez. Snovi vanj prehajajo z difuzijo, zato je presnova počasna. Glede na lastnosti medceličnine in vrsto ter razporeditev vlaken, razlikujemo tri tipe hrustanca: sklepni ali hialini, elastični in fibrilarni. Elastični hrustanec je zgrajen iz medceličnine, ki vsebuje elastične snovi in elastična vlakna, zgoščene v sredini. Iz tega tkiva so uhelj, poklopec sapnika, grlo in Evstahijeva cev. Sklepni hrustanec je iz amorfnegata, homogenega matriksa, ki ima steklast videz. Celice se v njem nahajajo v lakunah, v matriksu pa so kolagenska vlakna, zgoščena proti perifereiji. Sklepni hrustanec v embrionalnem stanju tvori zasnova za kosti, v zrelem, odraslem stanju pa obdaja predvsem kostne sklepe, poleg tega pa ga najdemo tudi v sapniku, bronhijih in predelu reber (Narandža in Vogrin, 2013; Štrus, 2002).

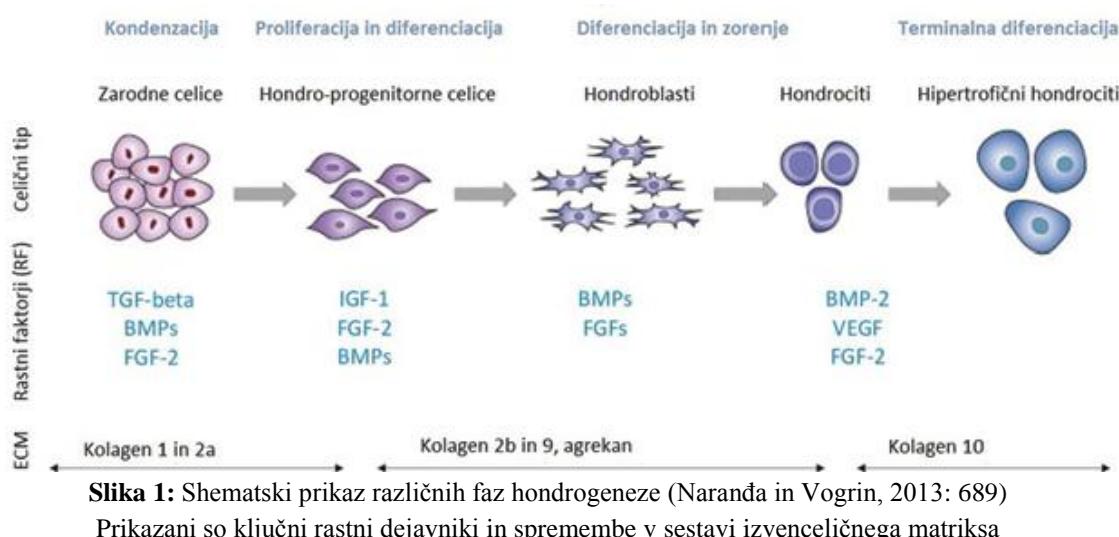
Za fibrilarni hrustanec so značilni gosti snopi kolagenskih vlaken, med njimi pa so redke hrustančne celice urejene v stolpce. Fibrilarni hrustanec se nahaja v medvretenčnih ploščicah in nekaterih sklepih. Hrustanec raste z delitvijo hondrocytov in z apozicijo iz zarodnih celic v perihondriju, ali z vrivanjem. V razvoju osebka hrustančni matriks kalcificira v procesu nastajanja nadomestne kosti, kalcifikacija pa je lahko tudi posledica staranja (Narandža in Vogrin, 2013; Štrus, 2002).

2.1.2 Hondrocyti

Hondrocyti so hrustančne celice, ki se v hrustancu nahajajo v skupinah. Proses njihove diferenciacije imenujemo hondrogenza. Ta je natančno nadzorovana pod vplivom rastnih in diferenciacijskih dejavnikov. Hondrocyti se razvijejo iz mezenhimskih celic v zgodnjih fazah razvoja zarodka. Z njihovo diferenciacijo v zrele hondrocyte se povečuje količina izvenceličnega matriksa. Odrasli hondrocyti tako proizvajajo velike količine medceličnine, ki je sestavljena iz kolagenskih vlaken, elastina in proteoglikanov. Večina rastnih dejavnikov se veže na specifične receptorje na membrani ali celic in s tem sprožijo prenos signalov. V citosolu se nato aktivirajo genski regulacijski proteini, ki sprožijo

prepisovanje določenih genov in s tem proizvodnjo za celice značilnih proteinov. Na diferenciacijo hondrocytov vplivajo rastni dejavniki, signalne molekule in efektorski proteini, pa tudi vitamini in hormoni. Pretvorbo informacij, ki izvirajo iz zunajceličnih signalov, v izražanje značilnih genov znotraj hrustančne celice, posredujejo transkripcijski dejavniki kot so SOX9, Smad, Msx2, STAT, Cbfa1 (Goldring, 2012; Meyer in sod., 2009; Stokes in sod., 2001).

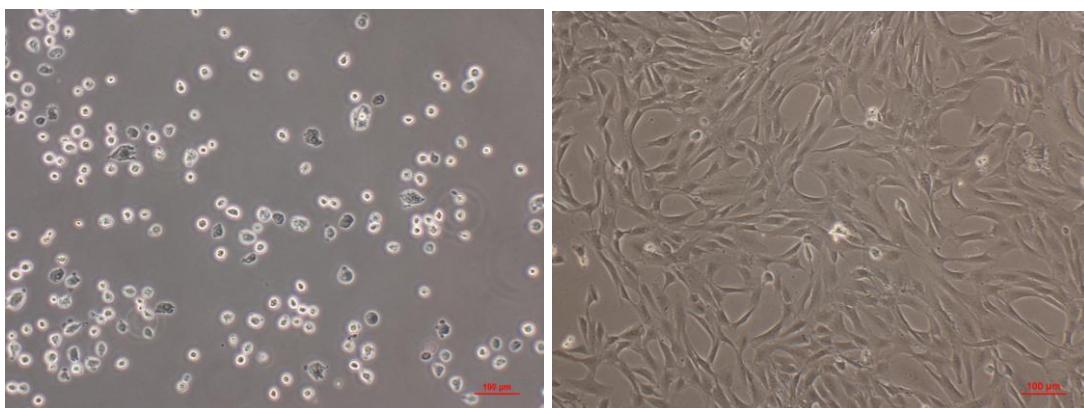
V procesu diferenciacije začnejo hondrocyti proizvajati značilne molekule hrustančne medceličnine (kolagen II, elastin). Za potek diferencijskega procesa so posebej pomembni rastni dejavniki: IGF-I (inzulin podobni rastni dejavnik), FGF-2 (fibroblastni rastni dejavnik), TGF- β (transformirajoči rastni dejavnik), proteini kostne morfogeneze (BMP-2, BMP-4, BMP-5 in BMP-7) (OP1) (Van Osch in sod., 2009; Gan in Kandel, 2007; Li in sod., 2005).



2.1.2.1 Hondrocyti gojeni *in vitro*

Hondrocyti v celični kulturi so adherentne celice. Pred gojenjem v pogojih *in vitro* jih moramo najprej izolirati iz hrustanca. Po izolaciji s pomočjo encimov se celice pritrdijo na podlago oz. rastno površino gojilne posode. Ob tem spremenijo obliko iz kroglaste v vretenasto in se začnejo deliti (Slika 2). Kultura enojnega sloja je najpogosteje uporabljana oblika gojenja hondrocytov, ki omogoča njihovo obilno namnoževanje. Pojav, ki ga spremljamo pri tovrstnem gojenju hondrocytov je proces dediferenciacije. Celice namreč proizvajajo vedno manj za hrustanec značilnih proteinov: kolagena II, agrekana in drugih, začnejo pa izločati večje količine kolagena I, kar je značilnost fibroblastov oz.

mezenhimskih celic, iz katerih se hondrocyti razvijejo (Marijnissen in sod., 2000; Mallein-Gerin in sod., 1991; Steward in sod., 2000). Ko tako gojene celice prenesemo v tridimenzionalno okolje pa zopet povečajo proizvodnjo za hrustanec značilnih proteinov (Velikonja in sod., 2001).



Slika 2: Morfologija hondrocytov v kulturi *in vitro*

A: Hondrocyti naseljeni v kulturo ob času t=0, B: hondrocyti v enoslojni kulturi po 3 dneh; 100x povečava

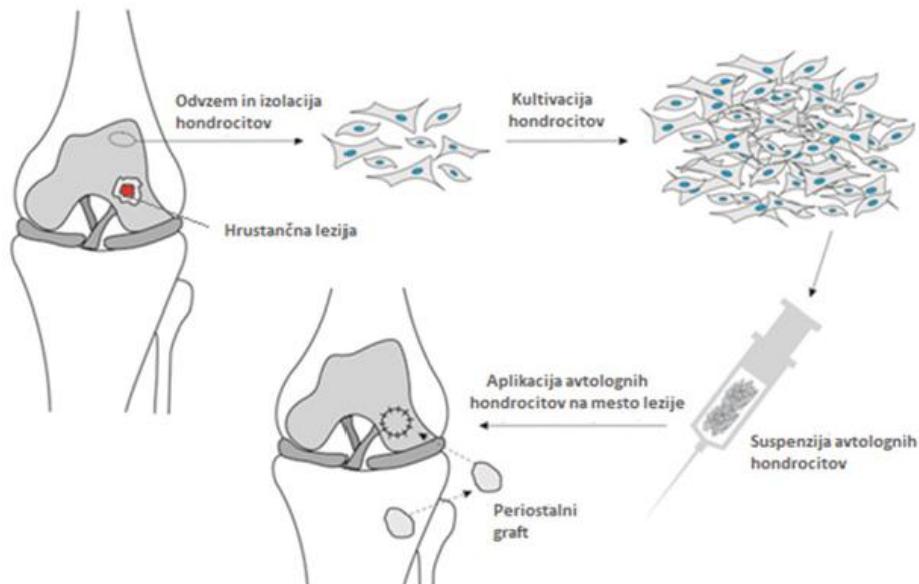
V optimalnih pogojih je čas podvojitve populacije hondrocytov približno 20 ur in je močno odvisen od gostote celic in sestave gojišča. Ko postane gostota celic prevelika se celice začnejo preraščati in pridobije drugačne lastnosti kot tiste v enoslojni kulturi. Kulture z veliko celično gostoto so tiste z več kot 10^5 celic/cm² gojilne površine. Takšna kultura lahko nastane zaradi celičnega preraščanja v enoslojni kulturi ali pa zaradi visoke gostote celic že na začetku naselitve. Na rast celične kulture pomembno vplivajo rastni dejavniki, hormoni, citokini, vitamini in druge sestavine gojišča (Adolphe in Benya, 1996).

Hondrocyti, ki jih gojimo v določenih pogojih *in vitro*, so zmožni rediferenciacije. Rediferenciarni hondrocyti se obnašajo podobno kot primarne celice, saj kažejo povečano izražanje genov za agrekan, kolagen tipa II, SOX9 ter zmanjšano izražanje kolagena tipa I. Takrat so tudi sposobni tvoriti hrustančno tkivo (Gan in Kandel, 2007). Rediferenciacija lahko sproži tudi hipertrofijo, kar se kaže v povečanem izražanju kolagena X (Ahmed in sod., 2009).

2.1.2.2 Terapevtska uporaba gojenih hondrocytov

S hondrocyti lahko zdravimo poškodbe hrustanca. Gojenje avtolognih hondrocytov za popravilo globokih poškodb kolenskega sklepnega hrustanca, ki se sicer sam le slabo in neustrezno regenerira, so pri nas začeli izvajati že leta 1996. Iz majhnega koščka

hrustančnega tkiva, ki ga kirurg ortoped sterilno odvzame z neobremenjene površine v sklepu, s pomočjo encimske razgradnje osamimo hondrocyte ter jih nato gojimo v enoslojni kulturi ob dodatku bolnikovega lastnega seruma. Namnožene celice s površine gojilnih posod odstranimo s tripsinom, njihovo suspenzijo pa uporabimo neposredno za vsaditev ali pa jo pred tem naselimo na kolagenski nosilec in takšen tkivno inženirski pripravek še nekaj časa gojimo *in vitro*. Cilj je pridobiti gostoto celic $2,6\text{--}5,0 \times 10^6 / \text{cm}^2$, kar predstavlja 25-30 podvojitev (Vunjak-Novaković in Freshney, 2006). Samo celično suspenzijo ali s celicami naseljeni nosilec kirurg ortoped injicira oziroma prenese v poškodovanoto mesto v kolenskem sklepu, ki ga v primeru uporabe suspenzije predhodno, v primeru nosilca pa naknadno, neprodušno prekrije z zaplato iz avtolognega periosta ali druge ustrezne biološko kompatibilne membrane (Slika 3). V vsakdanji praksi lahko zdravijo okvare s površinami od 1-15 cm² (Jeras, 2007; Vunjak-Novaković in Freshney, 2006).



Slika 3: Različne stopnje v procesu implantacije avtolognih hondrocytov (Naranda in Vogrin, 2013: 690)

2.2 LIZAT TROMBOCITOV

Leta 1998 je bil lizat trombocitov predstavljen kot medij za bogatenje kostnih nadomestkov v terapevtske namene. Od takrat so ga večkrat uporabljali v medicinskih raziskavah, katerih cilj je bil izboljšanje regeneracije tkiv (Pereira in sod., 2013). Lizat trombocitov so predlagali kot alternativo človeškemu in živalskemu serumu (FBS). Kot smo že omenili je najprimernejša uporaba človeškega avtolognega seruma, vendar je

njegovo pridobivanje pogosto težavno ali celo onemogočeno zaradi logistike in bolezenskega stanja pacienta. Uporaba FBS pri pripravljanju izdelkov za celične terapije pa je lahko razmeroma nevarna zaradi možnosti prenosa antigenih, ksenogenih proteinov in raznih zoonoznih okužb. Visoka stopnja variabilnosti med različnimi postopki priprave trombocitov, nestandardizirane proizvodnje in pomanjkanje nadzora kakovosti overjenih postopkov otežuje pridobitev soglasij za uporabo novejših dodatkov gojitvenemu mediju (Muraglia in sod., 2013).

Pereira in sod. poročajo o pozitivnem biološkem učinku lizata trombocitov (PL) na človeške primarne hondrocyte iz sklepnegra hrustanca. Ugotovili so, da je PL, ki so ga dodali v medij, veliko boljši v primerjavi s tistim, ki je vseboval »tradicionalni« fetalni goveji serum (FBS). PL je povzročil pospešeno rast celic in vzpodbudil proliferacijo celičnih linij tudi v pogojih, pri katerih se celice gojene v FCS niso razmnoževale, bodisi zaradi same narave celic ali njihovega tkivnega izvora. Rastni dejavniki, ki jih sproščajo aktivirani trombociti imajo stimulativen učinek na proliferacijo, migracijo in diferenciacijo različnih vrst celic, vključno s endotelijskimi, osteoblasti, fibroblasti, hondrocyti, celicami zobne pulpe, MSC izoliranimi iz maščobnega tkiva in MSC iz kostnega mozga (Muraglia in sod., 2013). Bieback (2013) v članku navaja, da PL vsebuje sledeče rastne dejavnike: trombocitni rastni dejavnik (PDGF), transformirajoči rastni dejavnik β (TGF- β), inzulinu podoben rastni dejavnik (IGF), vaskularno-endotelijski rastni dejavnik (VEGF), fibroblastni rastni dejavnik (FGF-2/bFGF), hepatocitni rastni dejavnik (HGF) in epidermalni rastni dejavnik (EGF).

Muraglia in sod. (2013) priporočajo uporabo liofiliziranega pripravka trombocitov, saj so ugotovili, da 5 % tovrstnega PL najbolje spodbuja poliferacijo primarnih celic, kot so fibroblasti človeške kože, hondrocyti iz sklepnegra hrustanca, osteoblasti in MSC iz kostnega mozga. Višje koncentracije so bile manj učinkovite ali celo toksične za celice. V primeru celic HeLa pa je priporočljiva še manjša koncentracija lizata trombocitov kot za primarne celice.

2.2.1 Lizat človeških trombocitov LYSEX™ Premium

Lysex™ Premium je proizvod **Sclavo Diagnostics International** iz Italije. Lizat človeških trombocitov predstavlja alternativo živalskemu (FBS) in človeškemu serumu v mediju za gojenje različnih vrst celic. **Lysex™ Premium** je sestavljen iz dveh komponent. Možnost njunega mešanja v različnih razmerjih omogoča prilagoditev oz. optimizacijo za gojenje posamezne vrste celice. Lizat trombocitov so testirali (celična rast, vitalnost) na različnih vrstah celic, vključno z mielomi, hibridomi, fibroblasti, hondrocyti, epitelnimi celicami, zarodnimi in odraslimi matičnimi ter jetrnimi celicami. Ugotovili so, da podpira

rast in viabilnost celic bolje kot FBS. Za nekatere tipe celic, tudi za odrasle matične celice, je zelo primeren kot dodatek za gojenje, saj njegova učinkovitost krepi celično proliferacijo in ohranja diferenciacijo. Muraglia in sod. (2013) priporočajo uporabo 5 % PL, saj so ugotovili, da v tej koncentraciji najbolje spodbuja poliferacijo primarnih celic, kot so fibroblasti iz človeške kože, hondrocyti iz sklepnega hrustanca, osteoblasti in MSC iz kostnega mozga. Višje koncentracije so se izkazale za manj učinkovite ali celo citotoksične. V primeru celic HeLa je priporočljiva še manjša koncentracija PL ko v primeru primarnih celic. Medij z lizatom trombocitov *LysexTMPremium* omogoča tudi proliferacijo hondrocytov starejših oseb, katerih namnoževanje v mediju z 10 % FBS ni tako uspešno. V predstavljivem letaku podjetje Sclavo Diagnostics International (Boost ..., 2013) namreč navaja, da se je v prisotnosti *LysexTMPremium* povečala tudi proliferacija celic, pridobljenih iz biopsije 77-letnega človeka (*LysexTMPremium*, 2013).



Slika 4: *LysexTMPremium*, proizvod Sclavo Diagnostics International (Italija)

2.2.1.1 Opis

LysexTMPremium je sterilen, liofiliziran lizat človeških trombocitov pridobljenih, iz več enot človeške krvi. Sestavljen je iz dveh komponent: *LysexTM*, ki je lizat plazme bogate s trombociti (PRP) in iz *Lysex Active DiluentTM*, ki je plazma z zelo majhnim številom trombocitov (PPP). Koncentracija trombocitov v komponenti: *LysexTM* je $1 \times 10^7/\mu\text{l}$. *LysexTM* vsebuje približno 100 ng/ml trombocitnega rastnega faktorja (PDGF) in 2 ng/ml vaskularno-endotelijskega rastnega faktorja (VEGF). V komponenti *Lysex Active DiluentTM* pa je koncentracija trombocitov $5 \times 10^4/\mu\text{l}$. Obe komponenti pred pripravo

shranjujemo na -20 °C, v oz. do datuma odtisnjenega na etiketi. Oba reagenta sta pred uporabo lahko tudi na 4 °C, vendar le 7 dni. Po vsakokratnem alikvotiranju oba hranimo na -20 °C, in sicer največ 60 dni. Pred uporabo moramo reagenta dobro premešati. Njuno ponavljajoče zamrzovanje in odtaljevanje pa ni priporočljivo (Lysex™Premium, 2013).

Trombocite lizirajo v roku dveh dni po zbiranju, jih predelajo in prenesejo v viale. Sledi sušenje z zamrzovanjem (liofilizacija) in shranjevanje pri -20 °C. Trombociti vsebujejo bioaktivne dejavnike, ki uravnavajo različne biološke funkcije in igrajo pomembno vlogo v procesih celjenja, vključno s kemoatrakcijo, celično proliferacijo, sintezo izvenceličnega matriksa, preživetjem celic in sprožitvijo angiogeneze. V trombocitnem lizatu ni prisotnih mikroorganizmov, mikoplazm in endotoksinov (Lysex™Premium, 2013).

Lysex™ in *Lysex Active Diluent™* dodamo osnovnemu mediju v različnih koncentracijah glede na vrsto celic, ki jih želimo gojiti (Lysex™Premium, 2013).

2.3 VERIŽNA REAKCIJA POMNOŽEVANJA V REALNEM ČASU (RT-qPCR)

Verižna reakcija pomnoževanja v realnem času predstavlja nadgradnjo običajne verižne reakcije s polimerazo DNA (PCR - sinonimi: kinetični ali kvantitativni PCR). Je metoda s katero lahko določimo začetno količino produkta reakcije PCR v posameznem ciklu in s tem določimo začetno število kopij matrične DNA v vsakem ciklu reakcije. Uporabljamo jo lahko za meritve absolutne (diagnostika, število genov, število plazmidov na celico, itn.) ali relativne kvantifikacije (študije genskega izražanja), alelne diskriminacije in za t. i. plus/minus študije (diagnostika) (Slanc, 2007).

2.3.1 Princip metode RT-qPCR

Za študije izražanja genov se uporablja metoda RT-qPCR (reverse transcription-quantitativne PCR; verižna reakcija pomnoževanja v realnem času), ki omogoča merjenje nastalega produkta v eksponentni fazi reakcije PCR. V tej fazi se določi tudi pražno fluorescenco, pri kateri je intenziteta odziva značilno višja od ozadja. Cikel, v katerem vzorec preide to mejo, imenujemo Ct (Cycle threshold). Vrednosti Ct so obratno sorazmerne z začetnim številom kopij matrične DNA. Načinov za detekcijo produktov reakcije je več. Nespecifični način detekcije poteka z barviloma SYBR Green I ali EvaGreen™. Temelji na vezavi barvila v nastajajočo dvovijačnico in posledično povečanju fluorescence. Specifični način detekcije pa poteka z uporabo sistemov z označenimi sondami oz. začetnimi oligonukleotidi. Glede na njihov tip ločimo hidrolizirajoče in hibridizacijske sonde. Prve, t.i. sonde TaqMan izkoriščajo 5'-eksonukleazno aktivnost DNA-polimeraze.

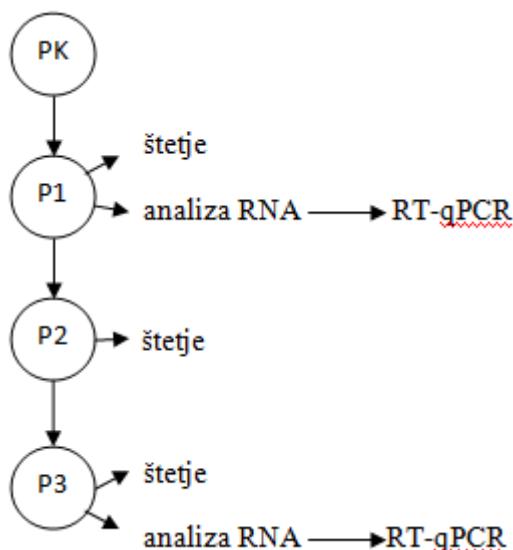
Način detekcije je osnovan na tehnologiji FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), ki zaznamuje odzivno razdalje interakcije med molekulama uporabljenih barvil. Pri eksitaciji pride do prenosa energije donorskega (reporter) na receptorsko barvilo (dušilec), pri tem pa ne pride do emisije fotona. Ko pa se dušilec in reporter ločita, pri eksitaciji reporter zasveti (Slanc, 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK POSKUSOV

Proučevali smo vplive komercialno dostopnega lizata trombocitov *LyseX™ Premium* (PL) na rast in fenotip hrustančnih celic izoliranih iz biopsij kolenskega sklepa in ušesnega hrustanca. Vpliv PL smo primerjali z gojenjem celic ali v prisotnosti človeškega serumca ali FBS. Želeli smo ugotoviti primernost PL za gojenje teh dveh vrst celic v klinične namene. Iz zamrznjenih vzorcev primarnih kultur hondrocytov smo izbrali šest naključnih bolnikov, ki so prostovoljno prispevali višek vzorcev celic v raziskovalne namene. Hondrocyte smo gojili v štirih različnih medijih, in sicer v treh ponovitvah za vsak vzorec. Za uporabo vzorcev smo pridobili odobritev komisije za medicinsko etiko (KME).

Celice iz primarnih kultur (PK) smo naselili v gostoti 5.000 celic/cm^2 v gojilno ploščo z 12 vdolbinicami ter jih gojili do 80-90 % konfluence v prvi pasaži (P1). Nato smo jih odlepili od dna gojilne plošče s pomočjo tripsina, jih prešteli s hemocitometrom ter jih naselili na gojilno ploščo za drugo pasažo (P2), in sicer z isto začetno gostoto, to je 5.000 celic/cm^2 . Iz vzorcev P1 smo preostanek celic odvzeli za izolacijo RNA. Ko so hondrocyti v P2 dosegli 80-90 % konfluenco smo jih zopet odlepili od dna gojilne plošče s pomočjo tripsina, jih prešteli ter v gostoti 5000 celic/cm^2 prenesli v gojilno ploščo za tretjo pasažo (P3). Preostanek celic iz P2 smo zamrznili. Ko so celice v P3 dosegle 80-90 % konfluenco smo jih obdelali po istem postopku kot predhodnje. Najprej smo jih odlepili s tripsinom, jih prešteli ter pripravili vzorce za izolacijo RNA. Gojilne medije smo zamenjali trikrat do štirikrat na teden. Shema poteka dela je prikazana na Sliki 5.



Slika 5: Potek dela

Legenda: PK= primarna kultura; P1= prva pasaža; P2= druga pasaža, P3= tretja pasaža

Štetje in živost celic smo preverjali s standardno metodo barvanja s tripanskim modriliom in s štetjem s hemocitometrom.

Izražanje genov, ki kodirajo gradbene enote obeh hrustančnih tkiv, specifične za elastični hrustanec, smo analizirali z metodo RT-qPCR. Celotno RNA iz vzorcev smo izolirali s pomočjo GenElute Mammalian Total RNA Kit (Sigma, ZDA) in izmerili koncentracijo RNA. To smo nato prepisali v cDNA s pomočjo encima reverzne transkriptaze (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, ZDA). Izražanje genov smo analizirali z metodo PCR v realnem času, dobljene podatke pa obdelali s programoma SDS 2.4 (Applied Biosystems, ZDA) in Microsoft Excel.

3.2 UPORABLJENE KEMIKALIJE, POTROŠNI MATERIAL IN LABORATORIJSKA OPREMA

3.2.1 Kemikalije

Uporabili smo naslednje kemikalije:

- Medij D-MEM/F12 (1:1) (Gibco, ZDA),
- Medij Advanced DMEM/F12 (1:1) (Gibco, ZDA),
- Pufrsko raztopino DPBS (1:1) (Gibco, ZDA),
- Človeški serum (Zavod RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani, Educell d.o.o.),
- LyseTM Premium (Sclavo Diagnostics International, Italija),
- GlutaMaxTM (1:100) (Gibco, ZDA),
- Gentamicin (Gibco, ZDA),
- Tripansko modrilo – 0,4 % raztopina (Gibco, ZDA),
- Tripsin (Sigma, ZDA).

3.2.2 Drobni laboratorijski material

Uporabili smo naslednji laboratorijski material:

- Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija),
- Pipete za enkratno uporabo 5 in 10 ml (Costar, ZDA),
- Injekcijske brizge 20 ml, 50 ml (Tyco Kendall, Združeno kraljestvo V.B.),
- Gojlne plošče z 12 vdolbinami (TPP, Švica),
- Mikrocentrifugirke 1,5 ml (Costar, ZDA),
- Pipetni nastavki 10-100 µL in 100-1000 µL (Costar, ZDA),
- Polipropilenske centrifugirke 15 ml (Falcon, ZDA),
- Posodo za počasno zamrzovanje celic MrFrosty (Nalgene, ZDA),

- Sterilizacijski filter Minisart 0,2 µm (Sartorius, Nemčija),
- Stojalo za centrifugirke in mikrocentrifugirske,
- Viale za zamrzovanje (Falcon, ZDA).

3.2.3 Laboratorijska oprema

Uporabili smo naslednjo laboratorijsko opremo:

- Centrifuga (Sigma, ZDA),
- CO₂ inkubator (Sanyo,ZDA),
- Hladilnik (+4 °C) in zamrzovalnik (-20 °C in -80 °C) (Gorenje, Slovenija),
- Invertni mikroskop TMS (Nikon, Japonska),
- Pipetor za pipete, Pipetboy (Integra, Švica),
- Tekoči dušik,
- Grelni blok (Biometra, Nemčija),
- Zaščitna mikrobiološka komora (Iskra Pio, Slovenija).

3.3 PRIPRAVA MEDIJEV

Medije smo pripravljali sproti in jih porabili v roku enega tedna. Shranjevali smo jih v hladilniku pri +2-8 °C. Volumen vseh pripravljenih medijev je bil 10 ml. Pripravili smo 4 različne medije, ki so se razlikovali glede na vsebnost komponente, ki spodbuja celično rast (človeški serum, FBS in PL v dveh različnih koncentracijah). *LysexTM* in *Lysex Active DiluentTM* smo dobili v liofilizirani obliki, zato smo jih morali predhodno pripraviti po postopku, ki ga predpisuje proizvajalec.

Postopek predpriprave *LysexTM Premium*:

- Liofilizirana reagenta pustimo nekaj časa na sobni temperaturi.
- V vialo *LysexTM* aseptično dodamo 2,5 ml sterilne destilirane vode.
- V vialo *Lysex Active DiluentTM* aseptično dodamo 10 ml sterilne destilirane vode.
- Po dodatku vode vijali nežno premešamo in počakamo 2-5 min za popolno sinergijo komponent.

3.3.1 Medij 1 (M1)

Sestava M1 s 5 % človeškega seruma (hS):

- Medij Advanced DMEM/F12 (1:1),[- L-Glutamine] (Gibco, ZDA)
- Človeški serum (Zavod RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani, Educell d.o.o)
- Raztopina GlutaMax™ (Gibco, ZDA)
- Raztopina Gentamicina (Gibco, ZDA)

Postopek priprave M1 s 5% hS:

- Odtalimo človeški serum.
- Vse reagente prenesemo v sterilno zaščitno mikrobiološko komoro in pripravimo 15 ml centrifugirko ter membrano za sterilno filtracijo (0,2 µm) in injekcijsko brizgo (20 ml).
- Vanjo odpipetiramo 9,3 ml Advanced DMEM.
- Dodamo 500 µl človeškega seruma (končna koncentracija 5 %) ter 200 µl raztopine GlutaMax (končna koncentracija 2%).
- Na koncu dodamo še 10 µl raztopine antibiotika gentamicina (končna koncentracija 50 µg/ml) in medij sterilno filtriramo.
- Sterilni medij dobro premešamo in postavimo v hladilnik do uporabe.
- Medij pred uporabo vedno segrejemo na 37 °C.

3.3.2 Medij 2 (M2)

Sestava M2 z 10 % FBS:

- Medij D-MEM/F12 (1:1) (Gibco, ZDA)
- FBS (Gibco, ZDA)
- Raztopina Gentamicin (Gibco, ZDA)

Postopek priprave M2 z 10 % FBS:

- Odtalimo FBS.
- Vse reagente prenesemo v sterilno zaščitno mikrobiološko komoro in pripravimo 15 ml centrifugirko.
- Vanjo odpipetiramo 9 ml DMEM.
- Dodamo 1 ml FBS (končna koncentracija 10 %).
- Na koncu dodamo še 10 µl raztopine antibiotika gentamicina (končna koncentracija 50 µg/ml)
- Sterilni medij dobro premešamo in postavimo v hladilnik do uporabe
- Medij pred uporabo vedno segrejemo na 37 °C

3.3.3 Medij 3 (M3)

Sestava M3 z 2,5 % PRP in 2,5 % PPP:

- Medij D-MEM/F12 (1:1) (Gibco, ZDA)
- LysexTM Premium (Sclavo Diagnostics International, Italija)
- Raztopina Gentamicina (Gibco, ZDA)

Postopek priprave M3 z 2,5 % PRP in 2,5 % PPP:

- Odtalimo LysexTM in Lysex Active DiluentTM
- Vse reagente prenesemo v sterilno zaščitno mikrobiološko komoro in pripravimo 15 ml centrifugirko.
- Vanjo odpipetiramo 9,5 ml DMEM.
- Dodamo 250 µl raztopine LysexTM in 250 µl raztopine Lysex Active DiluentTM (končna koncentracija 2,5 % LysexTM + 2,5 % Lysex Active DiluentTM).
- Na koncu dodamo še 10 µl raztopine antibiotika gentamicina (končna koncentracija 50 µg/ml).
- Sterilni medij dobro premešamo in postavimo v hladilnik do uporabe.
- Medij pred uporabo vedno segrejemo na 37 °C in dobro premešamo.

3.3.4 Medij 4 (M4)

Sestava M4 z 1 % PRP in 4 % PPP:

- Medij D-MEM/F12 (1:1) (Gibco, ZDA)
- LysexTM Premium (Sclavo Diagnostics International, Italija)
- Raztopina Gentamicina (Gibco, ZDA)

Postopek priprave 1 % PRP in 4 % PPP:

- Odtalimo LysexTM in Lysex Active DiluentTM.
- Vse reagente prenesemo v sterilno zaščitno mikrobiološko komoro in pripravimo 15 ml centrifugirko
- Vanjo odpipetiramo 9,5 ml DMEM.
- Dodamo 100 µl raztopine LysexTM in 400 µl raztopine Lysex Active DiluentTM (končna koncentracija 1 % LysexTM + 4 % Lysex Active DiluentTM).
- Na koncu dodamo še 10 µl raztopine antibiotika gentamicina (končna koncentracija 50 µg/ml).
- Sterilni medij dobro premešamo in postavimo v hladilnik do uporabe.
- Medij pred uporabo vedno segrejemo na 37 °C in dobro premešamo.

3.4 GOJENJE CELIC *IN VITRO*

V vseh poskusih smo uporabljali človeške hrustančne celice izolirane iz biopsij kolenskega sklepnega in ušesnega hrustanca. V celičnem in tkivnem inženirstvu je splošno uporabljena metoda gojenja celic enoslojna celična kultura, ki smo se ji posluževali tudi mi. Metoda je ekonomična, razmeroma nezahtevna in omogoča namnožitev velikega števila celic v kratkem času. Hondrocite smo gojili v CO₂ inkubatorju pri 37 °C, s 5 % CO₂ v zraku. Za delo s celičnimi kulturami in za pripravo medijev smo uporabljali zaščitne mikrobiološke komore (Iskra Pio, Slovenija) in izvajali aseptično tehniko. Pri enoslojni celični kulturi se srečamo s procesom dediferenciacije hondrocytov v fibroblastom podobne celice.

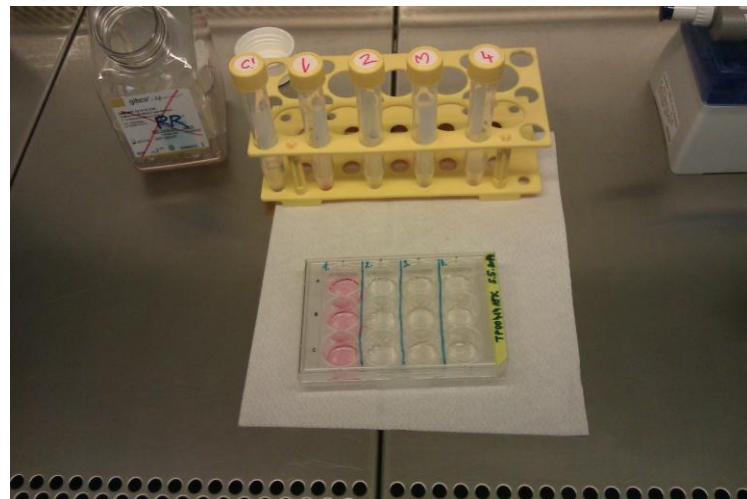
3.4.1 Odmrzovanje vzorca celic

Vialo z zamrznjenimi hondrocyti iz primarne kulture smo vzeli iz posode s tekočim dušikom in jo nato hitro odtalili pri 37 °C. Med odtaljevanjem smo celicam s pipeto dodajali serum (FBS) in jih prestavili v 50 ml centrifugirko. S hitrim delom in dodajanjem seruma preprečimo toksično delovanje krioprotектanta dimetilsulfoksida (DMSO). Celice smo nato dobro resuspendirali in odvezeli 20 µl vzorec za štetje in preverjanje njihove živosti.

3.4.2 Priprava hondrocytov od prve (P1) do tretje pasaže (P3)

Po štetju odmrznenih celic smo izračunali njihovo skupno število celic in preračunali željeno naselitveno gostoto. V našem primeru je bila slednja 5.000 celic/cm². Preračunani volumen celične suspenzije smo odpipetirali v 15 ml centrifugirko in ga centrifugirali 5 min, pri 300x g na sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo supernatant odlili ali odpipetirali. Dodali smo 3 ml ustrezne gojilne medije in celično usedlino dobro resuspendirali s pomočjo pipete. Po 1 ml celične suspenzije v vsakem od uporabljenih gojilnih medijev smo prenesli v posamezno vdolbinico gojilne plošče z 12 vdolbinami - 3 ponovitve (Slika 6). Gajilna površina posamezne vdolbine je 3,86 cm². Gajilno posodo smo dobro zaprli, označili in površinsko očistili pred vnosom v CO₂ inkubator. Ko so hondrocyti dosegli 80-90 % konfluenco v prvi pasaži, smo jih tripsinizirali, prešteli število celic v vsaki od treh vdolbinic ter določili skupno število živih celic za vsak preiskovani gojilni medij. Ta postopek smo morali ponoviti 4-krat, saj smo analizirali 4 različne medije. Od skupnega števila živih hondrocytov smo 5.000 celic/cm² naselili v novo gojilno ploščo in jim dodali ustrezni medij za drugo pasažo. Preostanek živih celic smo vzorčili za

izolacijo celokupne RNA. Gojilno ploščo s celicami za P2 smo dobro zaprli, označili in površinsko očistili pred vnosom v CO₂ inkubator. Ko so hondrocyti dosegli 80-90 % konfluenco, smo ponovili postopek za P3. Najprej smo celice tripsinizirali, jih prešteli in ponovno naselili po 5.000 celic/cm², v vsakem od medijev. Preostanek živih celic iz P2 smo zamrznili. Gojilno posodo smo prenesli v CO₂ inkubator. Ko so celice dosegle 80-90 % konfluenco, smo tripsinizacijo in štetje celic ponovili še zadnjič. Celice iz P3 smo vzorčili za izolacijo RNA, tako kot je opisano v poglavju 3.5.



Slika 6: Gojilna plošča z 12 vdolbinami za gojenje celic in pripravljena gojišča

3.4.3 Rast celic in tripsinizacija gojenih hondrocytov

Ko smo pod invertnim mikroskopom ugotavliali 80-90 % konfluenco, smo celične kulture obdelali s tripsinom. To je encim, ki adherentne celice odlepi od rastne podlage. Iz vdolbin plošče za gojenje smo najprej odstranili izrabljen gojilni medij, nato pa pritrjene celice 2-krat sprali z 1 ml PBS ob rahlem mešanju. Potem smo odstranili PBS in ga nadomestili s 0,5 ml raztopine tripsina. Gojilno ploščo smo 3 minute inkubirali na 37 °C in pod invertnim mikroskopom preverili ali so se celice odlepile. V kolikor se niso, smo gojilno ploščo rahlo stresali. V vsako vdolbinico smo nato dodali po 800 µl FBS, inhibitorja tripsina. Paziti smo morali, da smo delali dokaj hitro, saj je tripsin za celice lahko tudi toksičen. Celično suspenzijo smo nato odpipetirali v 15 ml centrifugirko, pri čemer smo vse vdolbine dobro sprali. Sledilo je centrifugiranje 5 min pri 300 x g na sobni temperaturi. Supernatant smo odlili in v vsako centrifugirko dodali po 1 ml DMEM in vsebino dobro resuspendirali. Iz suspenzije celic smo odvzeli 20 µl vzorec in prešteli celice.

3.4.4 Dohranjevanje hondrocytnih kultur

Primarne celične kulture hondrocytov smo prvič dohranjevali po 2 - 3 dneh od dneva naselitve. Izrabljen gojilni medij smo s pipeto previdno odstranili iz gojilne posode in ga nadomestili z ustreznim volumnom svežega, predogretega na 37 °C.

3.4.5 Zamrzovanje celic

Preostanek celic, ki jih po tripsinizaciji nismo potrebovali za nadaljnje poskuse, smo zamrznili. Najprej smo s štetjem določili skupno število celic v suspenziji in se odločili za količino, ki jo bomo zamrznili v posamezni viali za zamrzovanje. Nato smo celično suspenzijo centrifugirali 5 min, pri 300 x g, na sobni temperaturi. Supernatant smo odstranili in v resuspendirano celično usedlino ob steni počasi (zaradi toksičnega vpliva dimetilsulfoksida na celice) dodajali po 2 ml medija za zamrzovanje. Suspenzijo smo prenesli v ohlajene vijke za zamrzovanje, jih dobro zaprli in jih nato hitro prenesli v posodo za kontrolirano zamrzovanje MrFrosty, ki zagotavlja hitrost zamrzovanja 1°C /min. Po 24-urni inkubaciji na -80 °C smo viale prestavili v posodo s tekočim dušikom (-196 °C).

Sestava medija za zamrzovanje (za 1 vzorec potrebujemo 2 ml medija):

- 1 ml seruma (FBS)
- 0,75 ml medija DMEM
- 0,25 ml DMSO

3.4.6 Štetje celic s hemocitometrom

Celice smo prešeli po vsakem odtajevanju in tripsinizaciji. K 20 µl vzorca smo dodali 20 µl 0,4 % tipanskega modrila. Tripansko modriloobarva samo mrtve celice, saj lahko zaradi poškodovane membrane prodre v njihovo notranjost. Nato smo 20 µl mešanice s pipeto prenesli pod krovno stekelce števne ploščice in prešeli žive in mrtve celice v treh ponovitvah. Povprečno število mrtvih in živih celic smo delili z številom 9 (število manjših kvadratkov v posameznem kvadratku) in dobili povprečno število živih in mrtvih celic v kvadratku.

$$\text{Odstotek živih celic (\%)} = (\text{število živih celic} / \text{skupno število vseh celic}) * 100 \quad (1)$$

Izračunali smo tudi populacijsko podvajanje celic tekom pasažiranja, in sicer z naslednjo formulo (Cristofalo, 1998):

$$X = [\log_{10}(N_H) - \log_{10}(N_I)] / \log_{10}(2) \quad (2)$$

N_I = začetno število celic, ki smo jih naselili v kulturo

N_H = dobljeno končno število celic po tripsinizaciji

X = populacijsko podvajanje

Iz seštevka populacijskega podvajanja v posamezni pasaži lahko izračunamo kumulativno populacijsko podvajanje.

Skupno število živih celic v suspenziji smo izračunali s pomočjo naslednje formule:

$$N = n * R * V * 10^4 \quad (3)$$

N = skupno število živih celic v suspenziji

n = povprečno število preštetih živih celic v kvadratku hemocitometra

R = faktor redčenja zaradi mešanja s tripanskim modrilom (2)

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

3.5 PRIPRAVA CELIC ZA ANALIZO IZRAŽANJA GENOV

3.5.1 Izolacija celokupne RNA

Za izolacijo celokupne RNA smo iz vzorcev celic vsakega bolnika shranili:

- vzorec celic enoslojne kulture po tripsinizaciji prve pasaže za vse štiri gojilne medije,
- vzorec celic enoslojne kulture po tripsinizaciji tretje pasaže za vse štiri gojilne medije.

Vzorce celic enoslojnih kultur smo centrifugirali 5 min pri 300 x g, na sobni temperaturi ter odlili supernatant. Vsaki celični usedlini smo dodali po 250 µl pufra za lizo (GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit; Sigma, ZDA), vsebino dobro pretresli in takoj prenesli v skrinjo na -80 °C.

3.5.2 Merjenje koncentracije RNA

RNA smo izolirali za analizo izražanja genov s pomočjo RT-qPCR. Merjenje koncentracije RNA je smiselno izvesti, saj so nadaljnji postopki dolgotrajni in dragi. Dobro je namreč vedeti, če pri kakšnem vzorcu izolacija RNA ni uspela, najverjetneje zaradi premajhnega števila celic. Koncentracijo RNA smo izmerili s pomočjo reagenta RiboGreen in s čitalcem mikrotitrskih plošč za merjenje fluorescenece Chameleon (Hidex, Finska).

3.6 REVERZNA TRANSKRIPCIJA-PREPIS RNA V cDNA

S pomočjo High Capacity cDNA Archive Kit-a (Applied Biosystems, ZDA) smo prepisali celotno RNA v cDNA. Vzorec RNA smo vzeli iz zamrzovalnika in ga prenesli v hladni blok. Po potrebi smo ga redčili s prečiščeno vodo z 0,1 % DEPC.

Transkripcijsko mešanico za 1 vzorec smo pripravili iz naslednjih reagentov:

- 5 µl 10x pufra za obratno transkripcijo,
- 2 µl 25x raztopine dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP),
- 5 µl 10x raztopine naključnih začetnih oligonukleotidov,
- 2,5 µl RNA-znega inhibitorja,
- 2,5 µl encima MultiScribe,
- 0,5 µg vzorca RNA,
- do 50 µl prečiščene vode z 0,1% DEPC.

Mešanico smo inkubirali v grelnem bloku, in sicer deset minut na 25 °C, in potem še 120 minut pri 37 °C. Vzorce cDNA smo shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C.

3.7 VERIŽNA REAKCIJA POMNOŽEVANJA V REALNEM ČASU (RT-qPCR)

Mikrocentrifugirke z vzorci cDNA smo vzeli iz zamrzovalnika in jih prenesli v hladni blok. Redčili smo jih s prečiščeno vodo. V šest mikrocentrifugirk smo porazdelili ustreznno količino reagentov za vsak gen, in sicer beta-2-mikroglobulin (b2M), kolagen II (COL I), kolagen I (COL II), agrekan (ACAN), transkripcijski faktor (SOX9), verzikan (VCAN) (hialini hrustanec) ali elastin (ELN) (elastični hrustanec), ter tako pripravili reakcijsko mešanico, ki smo jo prenesli na hladni blok. Sonde in začetne oligonukleotide smo med pripravo reakcijske zmesi začitili pred svetlobo s pomočjo aluminijaste folije.

Sestava reakcijske mešanice za 1 vzorec za 10 µl reakcijo:

- 5 µl osnovne zmesi-TaqMan^R GeneExpression Master Mix (Applied Biosystems, ZDA),
- 0,5 µl raztopine začetnih oligonukleotidov in sonde TaqMan^R Gene Expression Assays-Assays on DemandTM (Applied Biosystems, ZDA),
- 2,5 µl prečiščene vode,
- 2 µl raztopine vzorca cDNA.

V optično ploščico s 384 luknjicami smo odpipetirali po 8 µl reakcijske mešanice, nato pa dodali še po 2 µl vzorca cDNA. Kot negativno kontrolo smo v šest luknjic namesto cDNA dodali po 2 µl prečiščene vode. Ploščico smo zlepili z optično samolepilno folijo, jo centrifugirali 2 minuti pri 1.000x g na sobni temperaturi in jo do analize hrаниli v hladilniku. Analizo smo izvedli z aparatom ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, ZDA). V računalniškem programu SDS 2.4 smo izbrali detektorje za specifične gene, volumen reakcije in število ciklov. Proses verižne reakcije pomnoževanja je potekal v treh fazah.

Verižna polimerizacija je tekla po naslednjem programu:

- Začetna denaturacija vzorca: 50 °C - 2min ter 95 °C - 10 min,
- 40 ciklov pomnoževanja: denaturacija pri 95 °C - 15 s ter prileganje začetnih oligonukleotidov in pomnoževanje pri 60 °C - 1min.

Rezultate meritev smo analizirali s pomočjo programov SDS 2.4 in Microsoft Excel. Prvi prikaže vrednosti Ct posameznih vzorcev. Vrednost Ct predstavlja zaporedno številko cikla, v katerem fluorescentni signal doseže določeno vrednost. Tako smo za vsak vzorec cDNA določili vrednost Ct, ki je obratno sorazmerna začetni koncentraciji cDNA. Vrednost Ct endogene kontrole gena b2M smo vsakič odšteli od Ct-vrednosti posameznega gena (ΔCt).

$$\Delta Ct = Ct_{(gena)} - Ct_{(b2M)} \quad (4)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{vzorca})} - \Delta Ct_{(\text{kalibratorja})} \quad (5)$$

Izražanje genov smo kvantificirali z metodo $\Delta\Delta Ct$, kjer smo za kalibrator uporabili odziv celic gojenih v M1(človeški serum).

V programu Excel smo izračunali spremembe v izražanju za posamezen gen (relativna kvantifikacija-RQ), ki nam povedo ali je izražanje specifičnega gena manjše ali večje od kalibratorja. Za lepši grafični prikaz ter boljšo primerjavo med vzorci smo te vrednosti prikazali v obliki $\log_2(RQ)$. Biološko razliko smo smatrali kot pomembno pri enkratni razliki med dobljenimi rezultati.

$$X = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (6)$$

X = Sprememba v ekspresiji gena

$$X = \log_2(RQ) \quad (7)$$

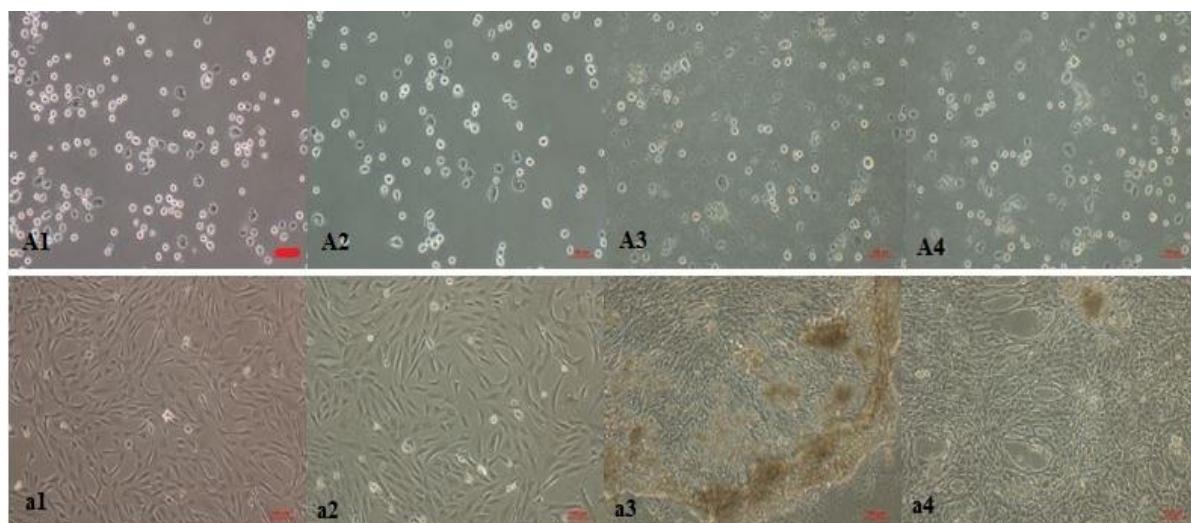
X = Biološka razlika

4 REZULTATI

4.1 ELASTIČNI HRUSTANEC

4.1.1 Morfologija in rast celic

Hondrocite pridobljene iz vzorcev elastičnega hrustanca (uhelj) treh različnih oseb (PB, KL, NN) smo naselili v gojilne plošče v štirih različnih medijih. Celice smo v enaki nasaditveni gostoti gojili do pojava 80-90 % preraščenosti oz. konfluence. Za kontrolo morfoloških in fenotipskih značilnosti smo uporabili hondrocite istega vzorca gojene v mediju s človeškim serumom (M1). Celice so pred pritrjevanjem na dno vdolbine gojilne plošče kazale značilno okroglo morfologijo. Pritrditev na rastno površino je pri večini celic in tudi v našem primeru predpogoj za začetek njihovih delitev. Hondrocyti gojeni v vseh štirih medijih, so po pritrditvi na površino gojilne plošče v enoslojni kulturi pridobili vretenasto fibroblastno obliko, z minimalnimi vidnimi razlikami. Tekom gojenja se je morfologija celic spremenila pri uporabi medijev M3 in M4, in sicer zaradi večje gostote proliferajoče celične kulture. V kulturah M1 in M2, kjer je bila rast celic počasnejša, pa so bile celice zelo razpotegnjene, z izrazito kontrastnimi znotrajceličnimi strukturami. Pri uporabi medijev M3 in M4 so imele celice, izrazito tiste, ki so rastle, bolj fibroblastno obliko (Slika 7). Preraščenost gojilne površine so celice gojene v medijih M3 in M4 dosegle veliko prej kot tiste, ki so rastle v M1 in M2. V povprečju so primarne kulture ob uporabi M3 in M4 dosegle konfluentno rast že po 3-4 dneh, tiste pri katerih smo uporabili medije M1 in M2 pa v 4-5 dneh.



Slika 7: Hondrocyti iz elastičnega hrustanca v prvi pasaži (P1) pod 100x povečavo (vzorec PB)
*Legenda slike je na naslednji strani

Legenda:

A1-A4: celice pred pritrjevanjem na dno vdolbine gojilne posode; a1-a4: celice po 4 dneh gojenja.

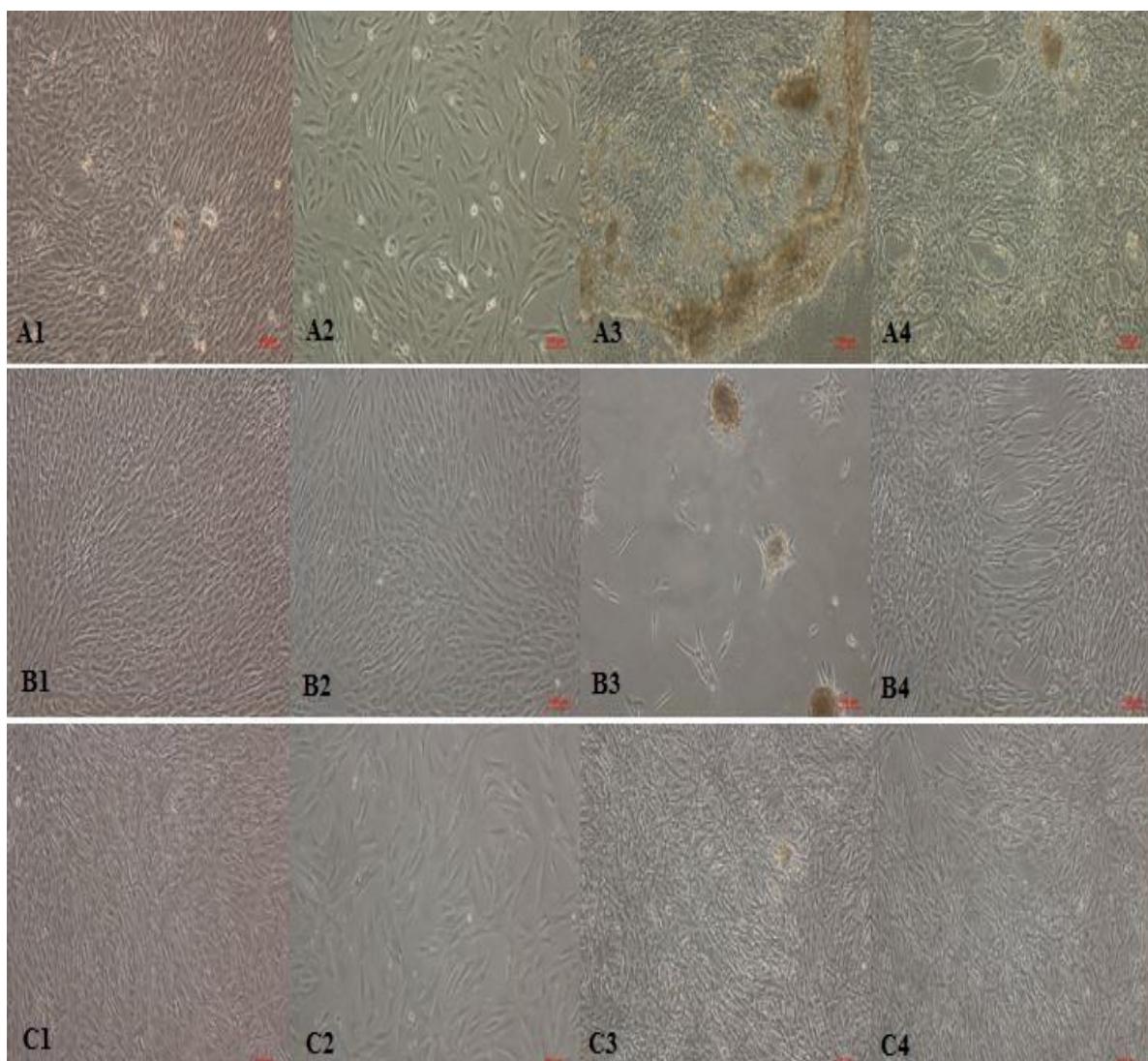
1 - M1 - 5 % človeški serum

2 - M2 - 10 % FBS

3 - M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

4 - M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)

Po tripsinizaciji hondrocytov in njihovi naselitvi v enaki gostoti kot v prejšnji pasaži ($5.000 \text{ celic}/\text{cm}^2$) se morfologija ni spreminala. Kontrolni vzorec so predstavljale celice gojene v M1. Sprva smo se glede na njihovo rast odločali kdaj jih je primerno presaditi v novo gojilno ploščo. Tekom pasaž smo v medijih M3 in M4 pri vseh preiskovanih vzorcih opazili nekakšne rjave okrogle skupke. Ugotovili smo, da gre za odlepljene celice. Pri uporabi M3 in M4 je bilo pritrjevanje hondrocytov na dno vdolbine gojilne plošče slabše kot pri M1 in M2. Da bi ugotovili kaj se dogaja s celicami v medijih M3 in M4, smo še podrobneje opazovali in primerjali njihovo rast z rastjo tistih, gojenih v M1 in M2. Glede na to, da so celice najhitreje rastle v M3, smo se odločili, da bo ta model predstavljal merilo, kdaj je potrebno izvesti tripsinizacijo in hondrocyte preseliti v novo gojilno ploščo (Slika 8-10). Rast oz. proliferacijo celic smo opazovali tekom P1, P2 in P3, fenotipe celic pa smo preverjali v P1 in P3 (shema na str.11).



Slika 8: Konfluentni hondrocyti iz elastičnega hrustanca prve pasaže (P1), tik pred tripsinizacijo

Legenda:

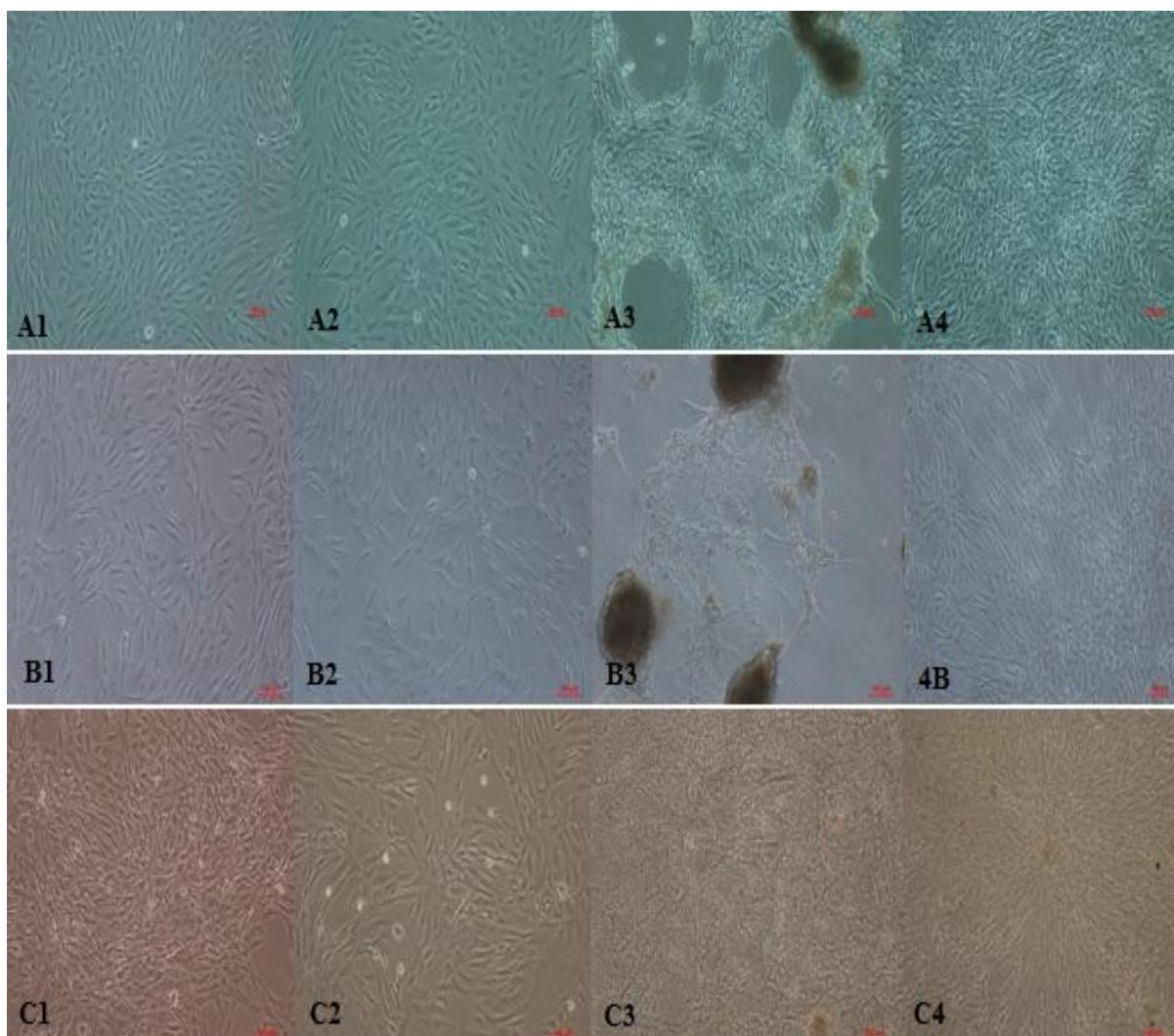
A1-A4-vzorec PB; B1-B4-vzorec KL; C1-C4-vzorec NN, 100x povečava)

1 - M1 - 5 % človeški serum

2 - M2 - 10 % FBS

3 - M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

4 - M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 9: Konfluentni hondrocyti iz elastičnega hrustanca druge pasaže (P2), tik pred tripsinizacijo

Legenda:

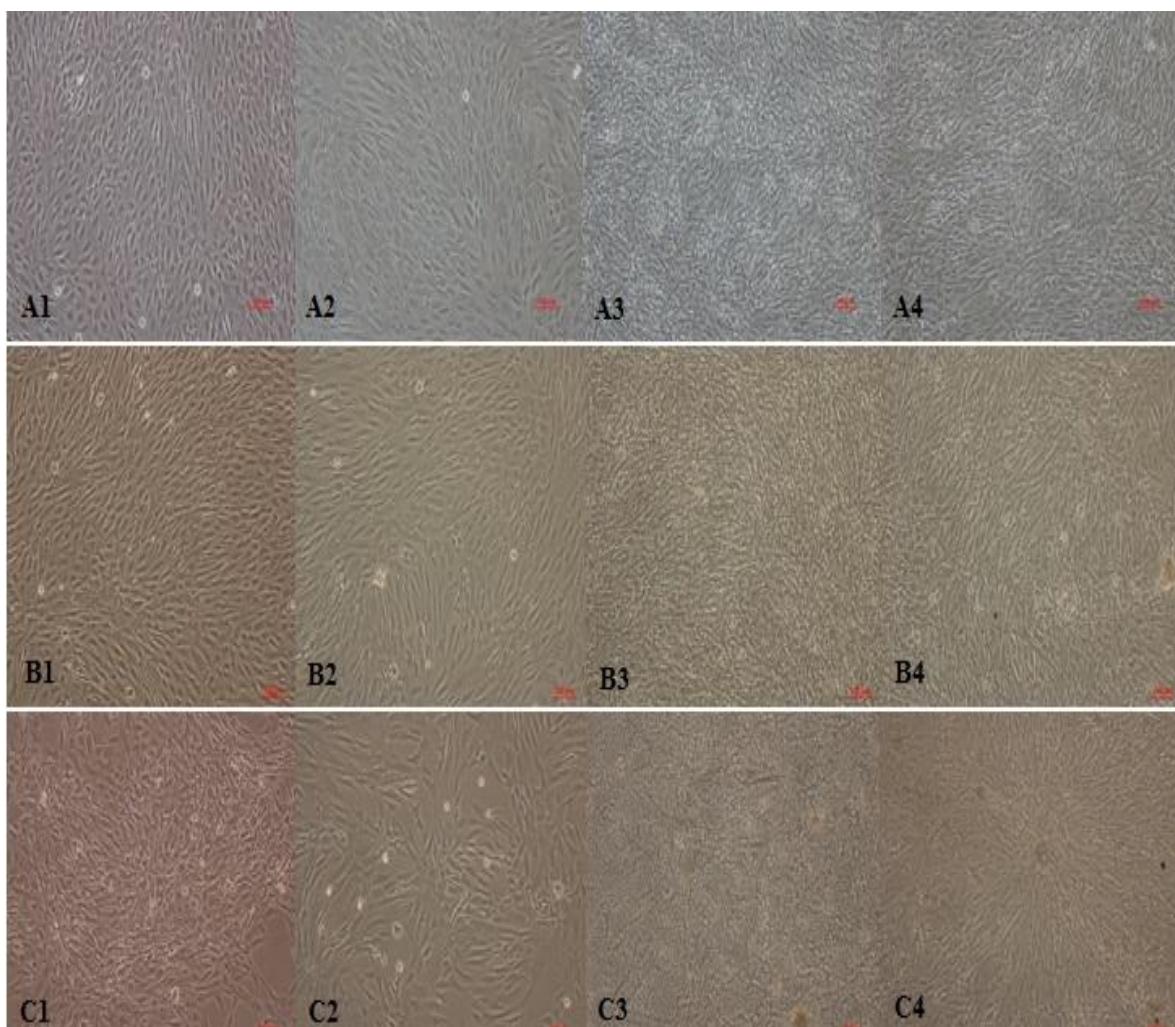
A1-A4-vzorec PB; B1-B4-vzorec KL; C1-C4-vzorec NN, 100x povečava)

1 - M1 - 5 % človeški serum

2 - M2 - 10 % FBS

3 - M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

4 - M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 10: Konfluentni hondrocyti iz elastičnega hrustanca tretje pasaže (P3), tik pred tripsinizacijo

Legenda:

A1-A4-vzorec PB; B1-B4-vzorec KL; C1-C4-vzorec NN, 100x povečava).

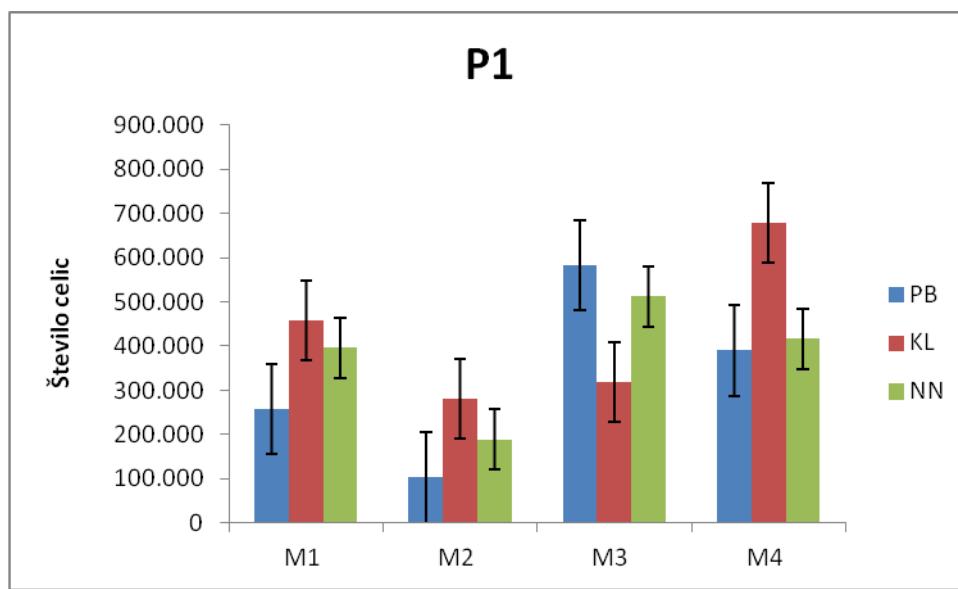
1 - M1 - 5 % človeški serum

2 - M2 - 10 % FBS

3 - M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

4 - M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)

Rast celic v kultuah smo vrednotili tudi s štetjem celic ob tripsinizaciji. Celice v medijih v katerih je prisoten LysexTM Premium (M3 in M4) so rastle zelo hitro v primerjavi s tistimi, gojenimi v M1 in M2. V vseh primerih smo celice naselili v enaki gostoti. Njihovo rast smo spremljali do 80-90 % konfluence, glede na uporabo M1 ali M3. Po tripsinizaciji smo njihovo število ugotavljali s štetjem s hemocitometrom. Na Slikah 11-13 je prikazano absolutno število hondrocytov za posamezne vzorce gojene v različnih medijih tekom vsake od pasaž. Vidimo, da je bila rast celic v vseh pasažah v medijih M3 in M4 večja od tiste v M1 in M2.



Slika 11: Povprečne vrednosti števila hondrocytov iz elastičnega hrustanca v posameznem mediju, v vseh treh vzorcih (PB, KL, NN) iz prve pasaže (P1)

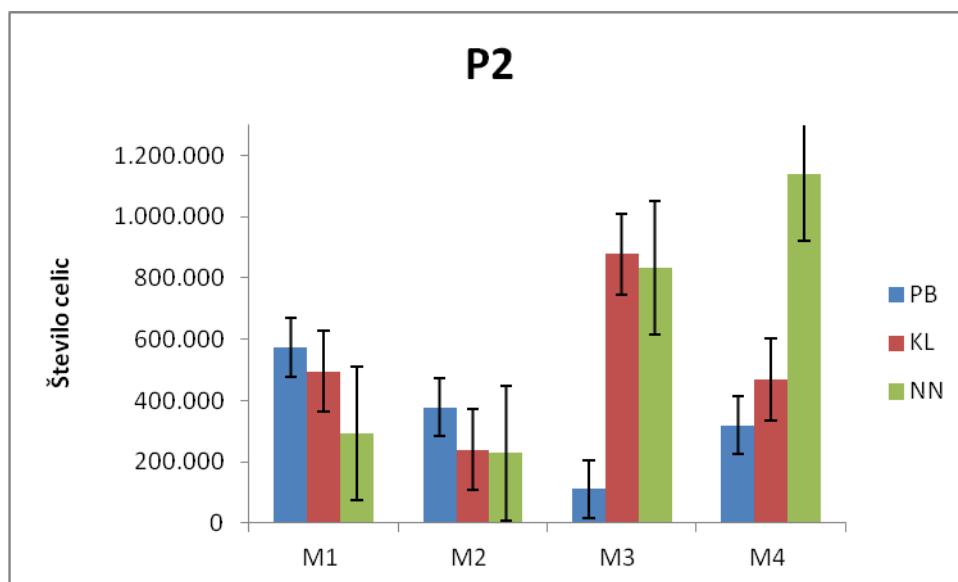
Legenda:

M1 - 5 % človeški serum

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 12: Povprečne vrednosti števila hondrocytov iz elastičnega hrustanca v posameznem mediju, v vseh treh vzorcih (PB, KL, NN) iz druge pasaže (P2)

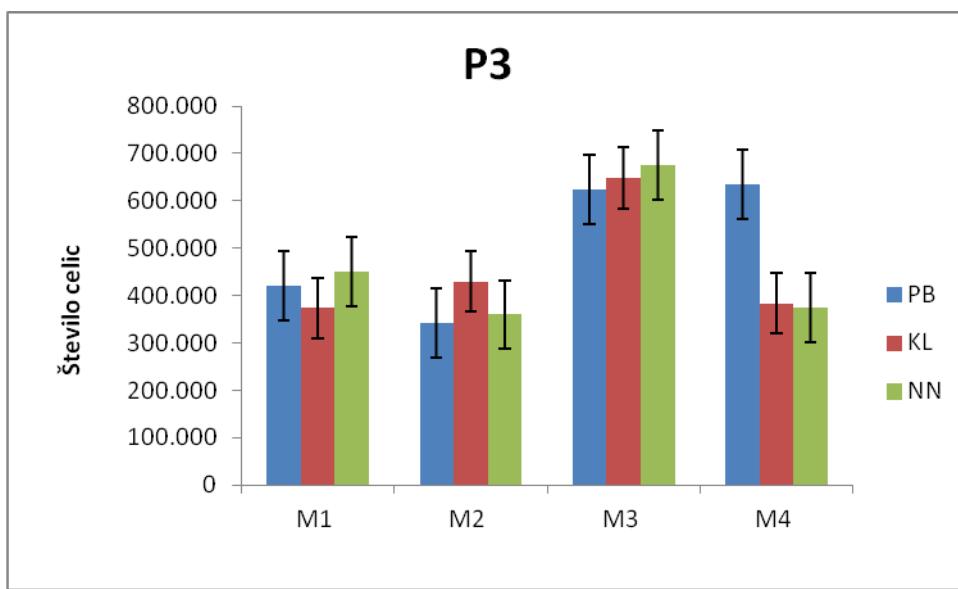
Legenda:

M1 - humani serum

M2 - FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 13: Povprečne vrednosti števila hondrocytov iz elastičnega hrustanca v posameznem mediju, v vseh treh vzorcih (PB, KL, NN) iz tretje pasaže (P3)

Legenda:

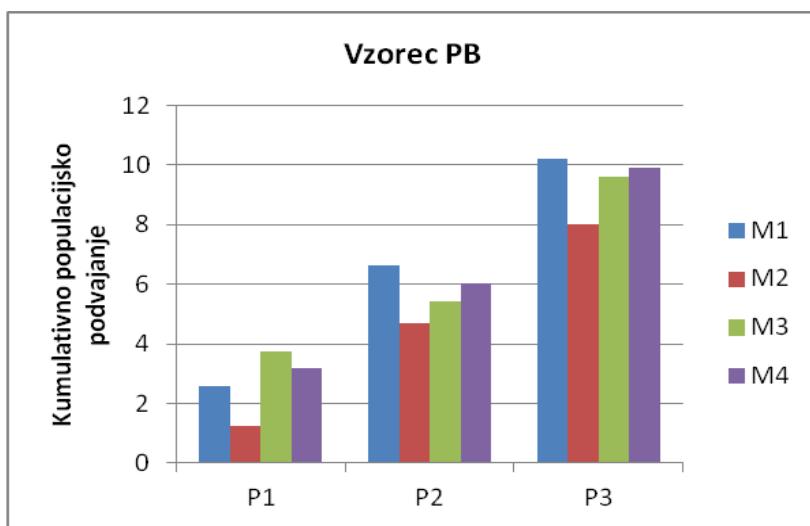
M1 - 5 % človeški serum

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% Lysex™ (PRP) + 2,5% Lysex Active Diluent™ (PPP)

M4 - 1 % Lysex™ (PRP) + 4 % Lysex Active Diluent™ (PPP)

Posamezni vzorci hondrocytov različnih vzorcev so se delili različno hitro. Rezultati kumulativnega populacijskega podvojevanja (KPD), izračunano s pomočjo enačbe napisane v poglavju 3.5.3 kažejo, da smo tekom vseh pasaž pri uporabi medijev M3 in M4 pridobili več hondrocytov iz elastičnega hrustanca v primerjavi z M1 in M2. Populacijsko podvajanje nam pove, koliko celic dobimo iz ene same, od začetka gojenja. V vseh treh vzorcih je bilo KPD ob uporabi medijev M3 in M4 približno 10. Najnižje vrednosti smo dobili pri uporabi M2, in sicer okrog 6. Vrednosti KPD v vzorcih gojenih v človeškem serumu (M1) pa so se gibale okrog vrednosti 8, razen pri vzorcu PB, kjer je KPD dosegla vrednost 10 (slika 14-16).



Slika 14: Kumulativno populacijsko podvajanje (KPD) hondrocytov iz elastičnega hrustanca v treh pasažah (P1, P2, P3) vzorca PB

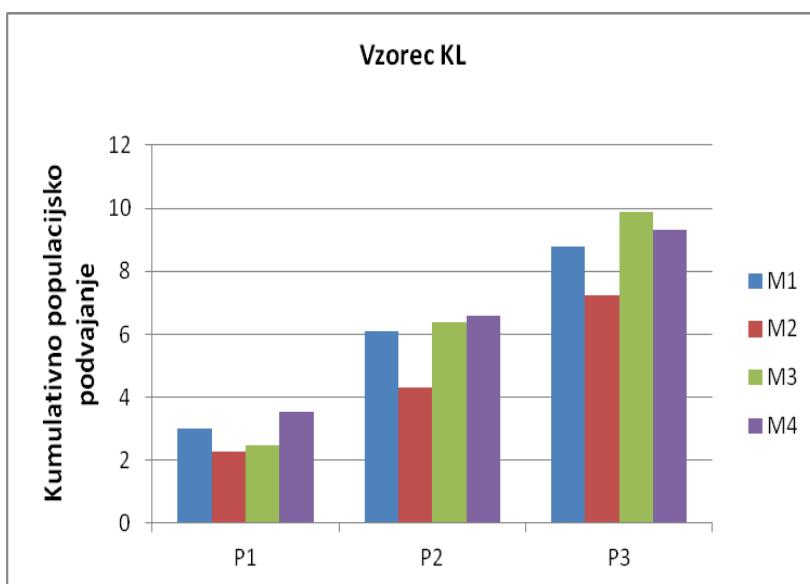
Legenda:

M1 - 5 % človeški serum

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

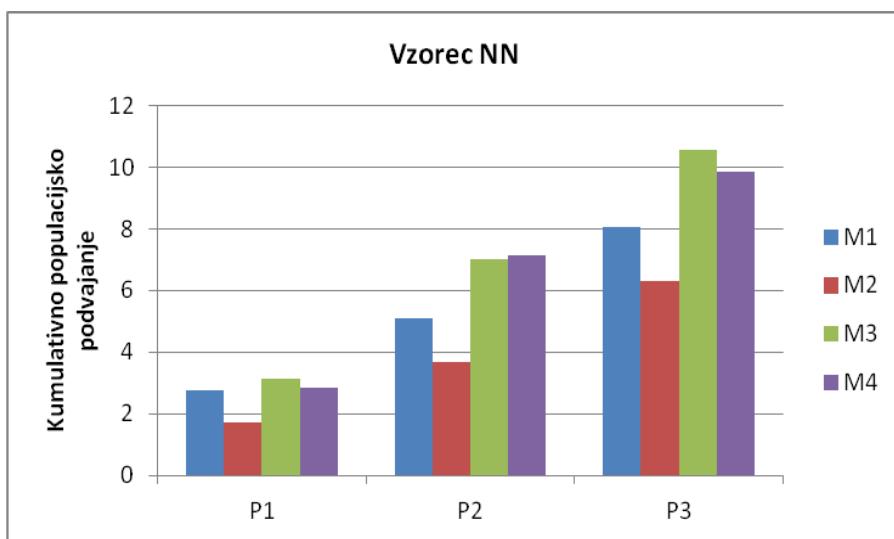
M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 15: Kumulativno populacijsko podvajanje (KPD) hondrocytov iz elastičnega hrustanca v treh pasažah (P1, P2, P3) vzorca KL

Legenda:

M1 – 5 % človeški serum; M2 – 10 % FBS; M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP); M4 - 1 % LysexTM (PL) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 16: Kumulativno populacijsko podvajanje hondrocytov (KPD) iz elastičnega hrustanca v treh pasažah (P1, P2, P3) vzorca NN

Legenda:

M1 - 5 % človeški serum

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

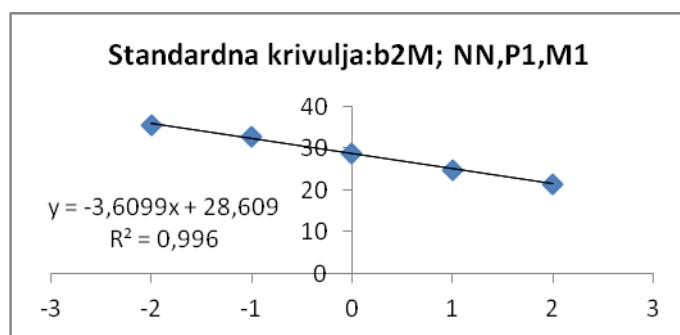
M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)

4.1.2 Izražanje genov hondrocytov iz elastičnega hrustanca, gojenih *in vitro*

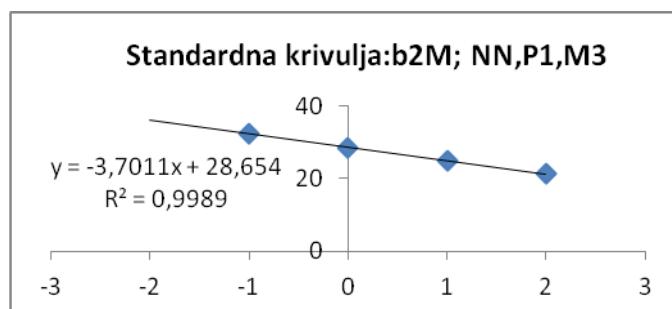
Iz gojenih hondrocytov smo po P1 in P3 izolirali celotno RNA in jo prepisali v cDNA (poglavje 3.6). Izražanje genov smo analizirali z metodo verižnega pomnoževanja v realnem času (poglavje 3.7). Zanimalo nas je izražanje tistih, ki so značilni za elastično hrustančno tkivo (ELN) pa tudi ostalih genov izvenceličnega matriksa. Preverjali smo tudi izražanje hondrocytnega transkripcijskega dejavnika (SOX9).

Osnovno merilo za naše raziskave so predstavljale celice, gojene v mediju M1 (človeški serum), ki smo jih uporabili za merjenje kvantitativnega izražanja genov. Standard izražanja genov pa je predstavljal gen za β 2 mikroglobulin (b2M). Gen b2M je t.i. »house keeping gene«, ki predstavlja osnovni metabolizem celice in je normalizator za količino hrustančne mRNA v reakciji. Za verodostojnost naših rezultatov smo preverili ali je pomnoževanje cDNA primerljivo tako pri visokih kot pri nizkih koncentracijah cDNA. Pomnoževanje začetnih oligonukleotidov smo analizirali za gena b2M in elastina. Pomnoževalno učinkovitost smo izračunali s pomočjo enačbe: učinkovitost = $e^{(\ln 10/\text{naklon premice})} - 1$. Iz naših rezultatov je razvidno, da je pomnoževalna učinkovitost enako uspešna pri visokih in pri nizkih koncentracijah cDNA (86 % - 89 %). Izračunavanje pomnoževalne

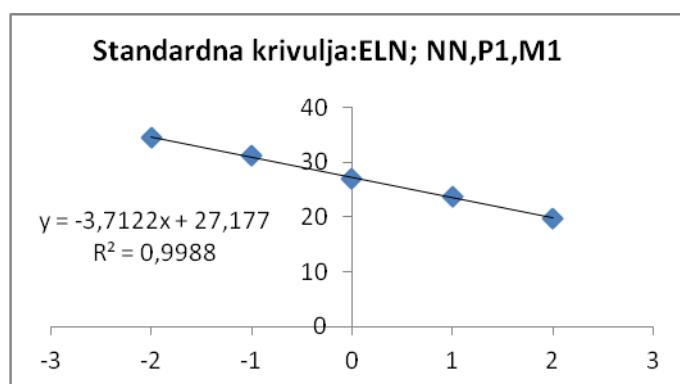
učinkovitosti za ostale gene pa so preverili že v predhodnih poskusih (ustno poročilo Educell). V prilogi A so podane vrednosti Ct za posamezno redčenje vzorca.



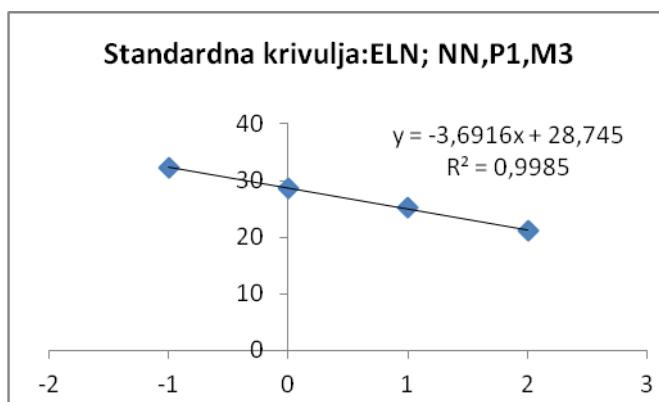
Slika 17: Standardna krivulja za gen b2M vzorca NN, gojenega v prvi pasaži v mediju M1
Pomnoževalna učinkovitost je 89%; $x=Ct$; $y=\log$ (količine)



Slika 18: Standardna krivulja za gen b2M vzorca NN, gojenega v prvi pasaži v mediju M3
Pomnoževalna učinkovitost je 86%; $x=Ct$; $y=\log$ (količine)



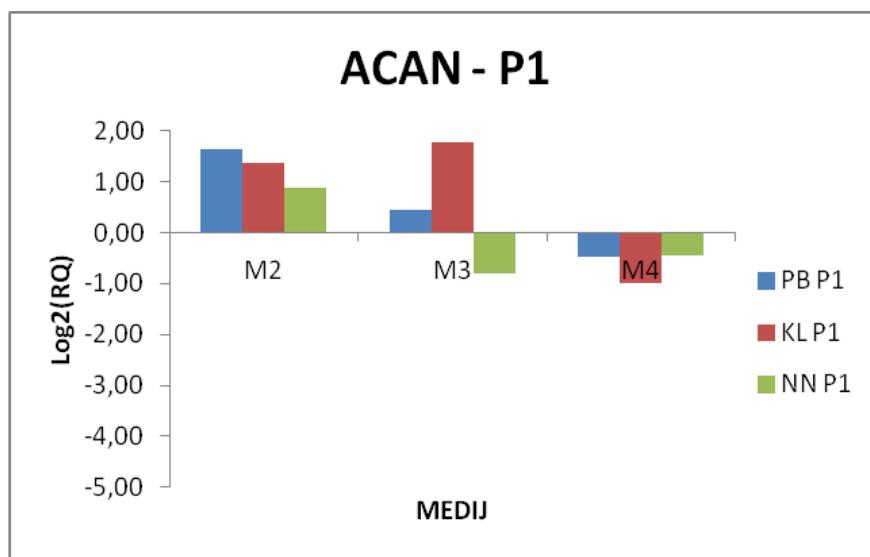
Slika 19: Standardna krivulja za gen elastina vzorca NN, gojenega v prvi pasaži v mediju M1
Pomnoževalna učinkovitost je 86%; $x=Ct$; $y=\log$ (količine)



Slika 20: Standardna krivulja za gen elastina vzorca NN, gojenega v prvi pasaži v mediju M3
Pomnoževalna učinkovitost je 87%; $x=Ct$; $y=\log$ (količine)

Rezultate izražanja genov (ACAN, COL II, COL I, ELN, SOX9) smo prikazali ločeno za pasažo P1 in P3, in sicer za vsak gen posebej. Vsak set podatkov za posamezen gen sestavljajo rezultati treh izbranih vzorcev hondrocytov iz elastičnega hrustanca. Na slikah so prikazane vrednosti $\log_2(RQ)$ umerjene na celice gojene v mediju M1. Kot biološko pomembno spremembo smo upoštevali spremembo v ekspresiji, ki je bila večja od 1, kar v linearni predstavitvi ustreza 2-kratni spremembi. Vrednosti med 0 in 1 torej ne predstavljajo biološko pomembnih sprememb, kar pomeni, da so podobne celicam, gojenim v mediju M1.

Izražanje genov je bilo v treh vzorcih, gojenih v štirih različnih medijih, ki smo jih analizirali, različno (priloga B, Slika 21-29). Izražanje agrekana (ACAN) v medijih M3 in M4 je bilo v P1 podobno tistim pri uporabi M1, zelo velik upad njihovega izražanja pa smo izmerili v P3. Znižanje izražanja za 3-4 na skali \log_2 pomeni 8–16-kratno znižanje na linearni skali (Sliki 21 in 22). Kolagen tipa I (COL I) se je izražal podobno pri uporabi vseh medijev tekom obeh pasaž (Sliki 23 in 24). Izražanje gena za kolagen tipa II (COL II) pa je bilo po P1, v medijih M2, M3 in M4 primerljivo s tistim v M1. Porast izražanja COL II za 2,5–3,5-krat smo opazili le v vzorcu NN. Po P3 pa izražanje tega gena sploh nismo zaznali (Slika 25). Tudi pri izražanju transkripcijskega dejavnika SOX9 ni bilo večjih omembe vrednih razlik (Slika 26 in 27). Poleg AGCN smo največjo razliko v izražanju genov v vzorcih gojenih v medijih M3 in M4, opazili v primeru elastina (ELN). Nivo njegovega izražanja se je namreč znižal za 3-4-krat v P1 in približno za 3-krat v mediju M3 v P3, kar, preračunano na linearno vrednost, pomeni 8-16 - kratno znižanje v P1 in 8 – kratno znižanje v P3 v mediju M3 (Slika 28-29).



Slika 21: Izražanje agrekana v hondrocytih iz elastičnega hrustanca, po prvi pasaži (P1), gojenih *in vitro*

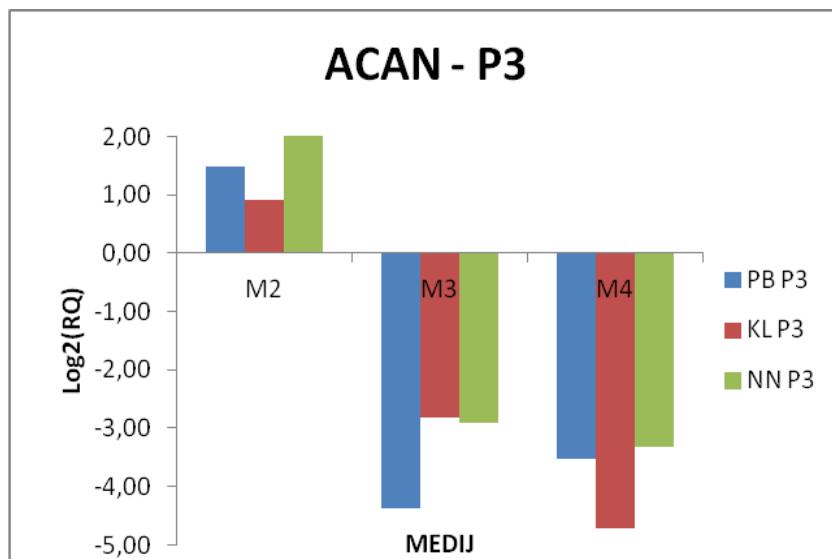
Legenda:

PB-oznaka vzorca 1; KL-oznaka vzorca 2; NN-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 22: Izražanje agrekana v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih *in vitro*

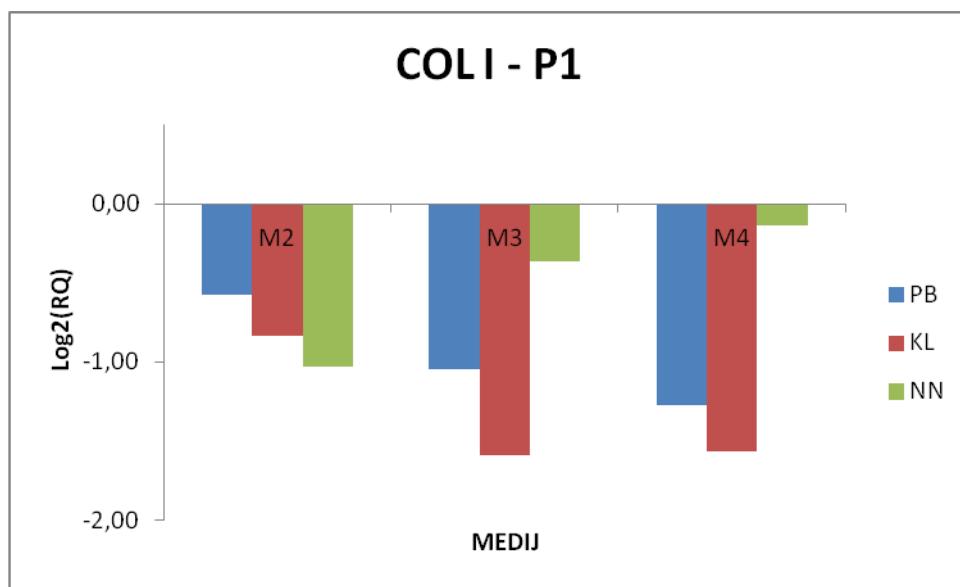
Legenda:

PB-oznaka vzorca 1; KL-oznaka vzorca 2; NN-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 23: Izražanje kolagena tipa I v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po prvi pasaži (P1), gojenih *in vitro*

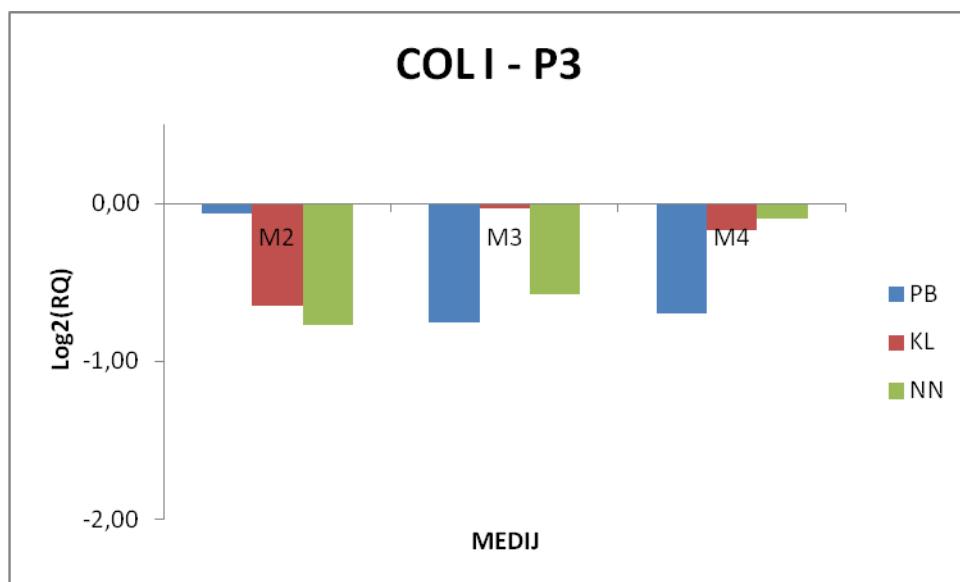
Legenda:

PB-oznaka vzorca 1; KL-oznaka vzorca 2; NN-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 24: Izražanje kolagena tipa I v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih *in vitro*

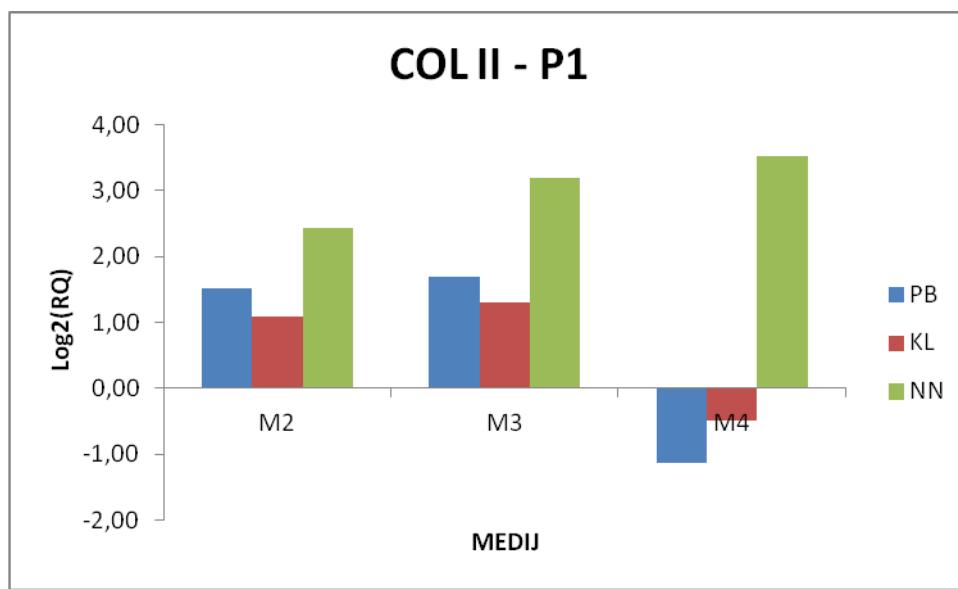
Legenda:

PB-oznaka vzorca 1; KL-oznaka vzorca 2; NN-oznaka vzorca 3

M2 - FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 25: Izražanje kolagena tipa II v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po prvi pasaži (P1), gojenih *in vitro*

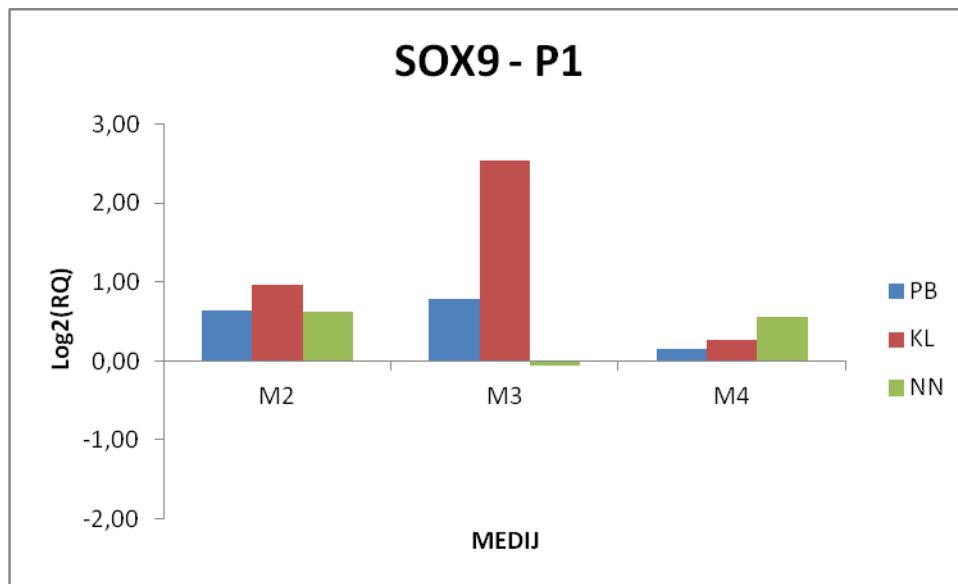
Legenda:

PB-oznaka vzorca 1; KL-oznaka vzorca 2; NN-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 26: Izražanje SOX9 v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po prvi pasaži (P1), gojenih *in vitro*

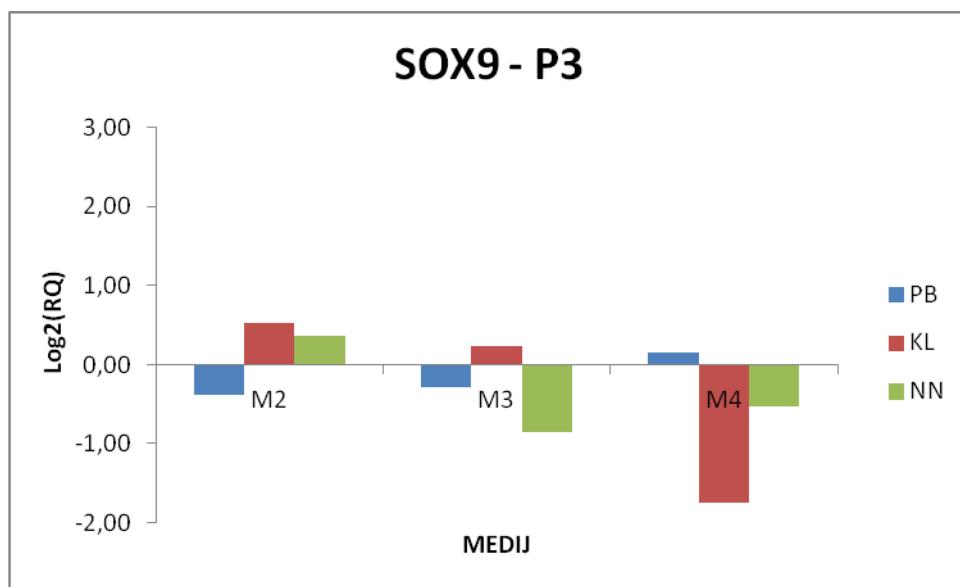
Legenda:

PB-oznaka vzorca 1; KL-oznaka vzorca 2; NN-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 27: Izražanje SOX9 v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih *in vitro*

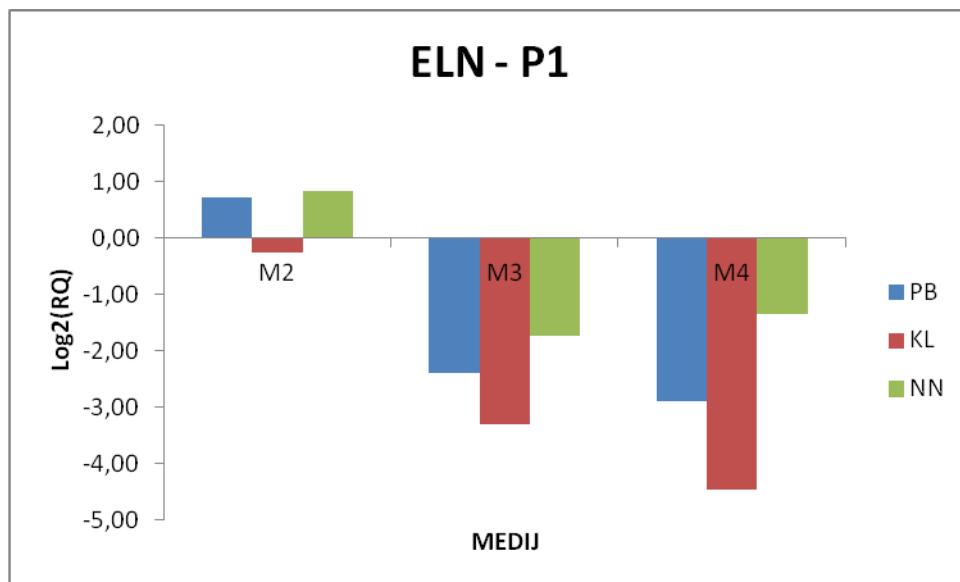
Legenda:

PB-oznaka vzorca 1; KL-oznaka vzorca 2; NN-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 28: Izražanje elastina v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po prvi pasaži (P1), gojenih *in vitro*

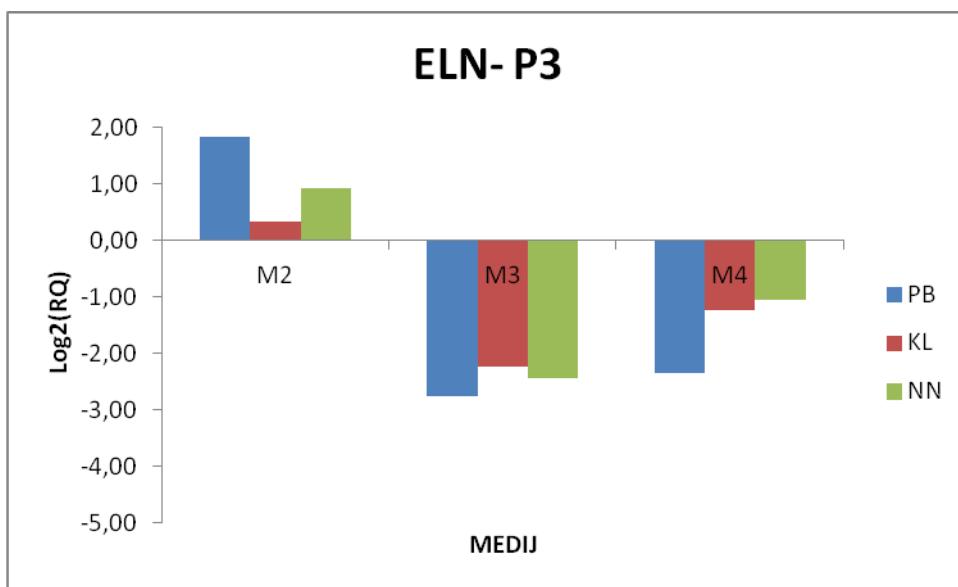
Legenda:

PB-oznaka vzorca 1; KL-oznaka vzorca 2; NN-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 29: Izražanje elastina v hondrocytih iz elastičnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih *in vitro*

Legenda:

PB-oznaka vzorca 1; KL-oznaka vzorca 2; NN-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% Lysex™ (PRP) + 2,5% Lysex Active Diluent™ (PPP)

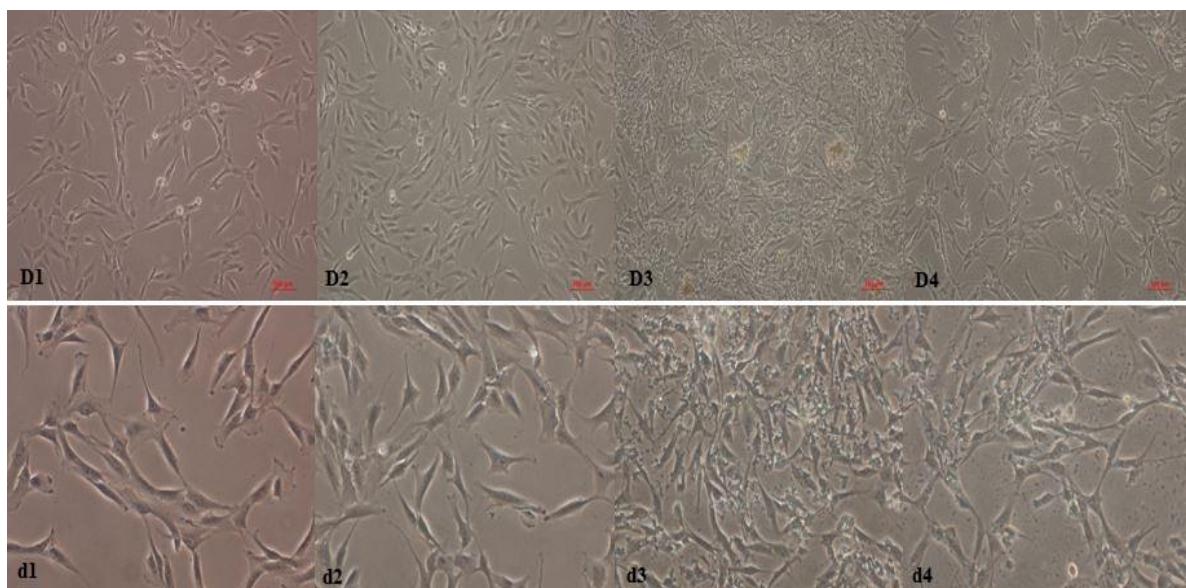
M4 - 1 % Lysex™ (PRP) + 4 % Lysex Active Diluent™ (PPP)

4.2 SKLEPNI (HIALINI) HRUSTANEC

4.2.1 Celična morfologija in rast celic

Hondrocyte pridobljene iz sklepnega hrustanca treh različnih oseb (TP, BU, FM) smo naselili v enoslojne kulture. Gojili smo jih do pojava 80-90 % konfluence. Kot kontrolo za morfološke in fenotipske značilnosti celic so nam služili hondrocyti istega vzorca, gojeni v mediju s 5 % človeškega seruma (M1). Celice so pred pritrjevanjem na dno gojilne plošče kazale značilno okroglo morfologijo. Pritrditev na dno vdolbine gojile plošče je predpogoj za začetek celične delitve. Vsi hondrocyti, ki smo jih gojili v vseh štirih medijih, so po pritrditvi na rastno površino v enoslojni kulturi pridobile vretenasto fibroblastno obliko, in sicer z minimalnimi razlikami. Tekom gojenja se je celična morfologija v medijih M3 in M4 spremenila, in sicer zaradi večje gostote celičnih kultur. V medijih M1 in M2, kjer je bila rast celic počasnejša, so celice zelo razpotegnjene, z izrazito kontrastnimi znotrajceličnimi strukturami, medtem ko so imele tiste, gojene v medijih M3 in M4 izrazitejšo fibroblastno obliko (Slika 30-33). Preraščenost gojilne plošine so celice, gojene v M3 in M4 dosegle veliko prej kot tiste, ki so rastle v prisotnosti medija M1 in M2. V

povprečju so primarne kulture v medijih M3 in M4 dosegle konfluentno rast že po 3-4 dneh, tiste v medijih M1 in M2 pa v 5-6 dneh.

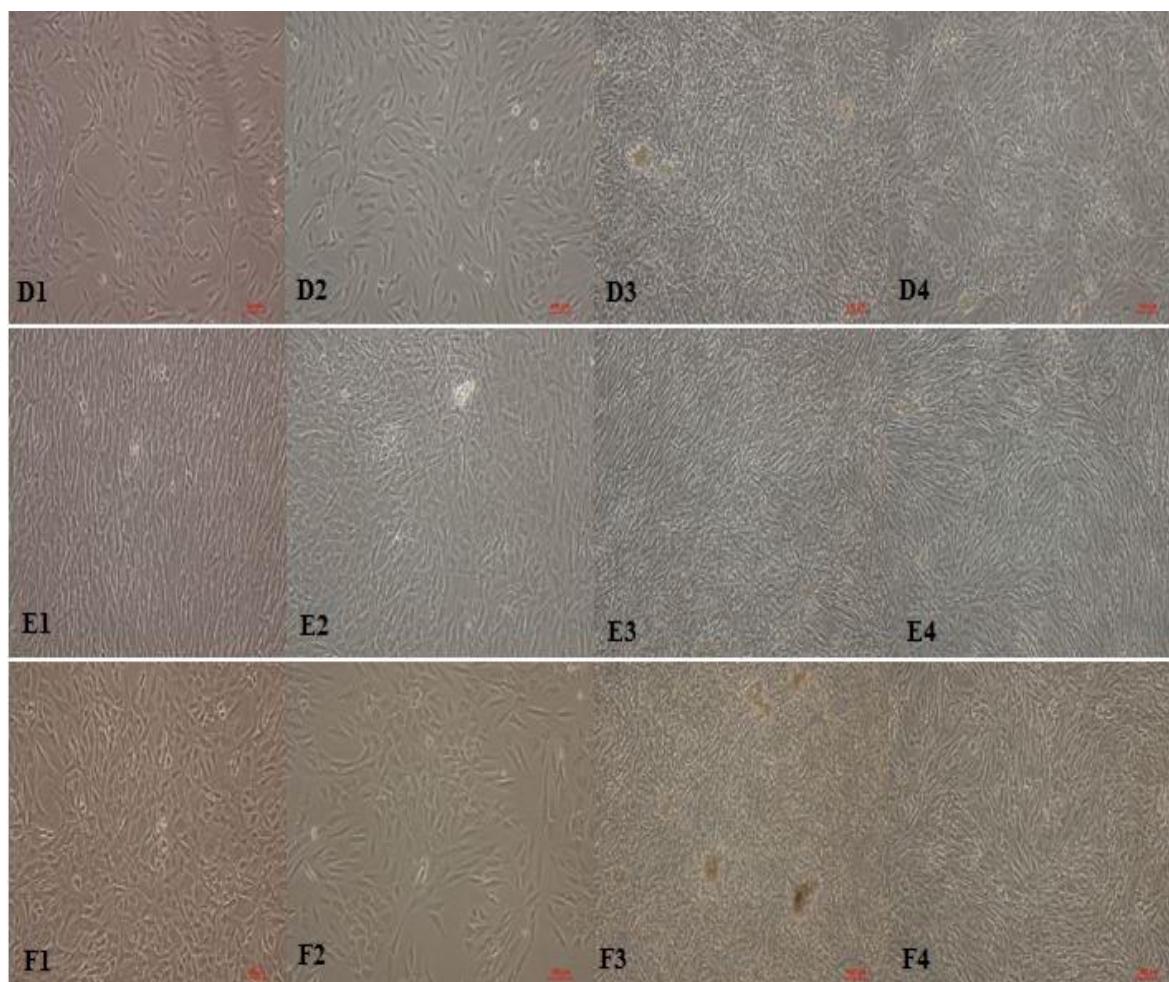


Slika 30: Hondrocyti iz sklepnega hrustanca v prvi pasaži (P1), pod 100x (D1-D4) in 200x povečavo (d1-d4) -vzorec TP

Legenda:

- 1 - M1 - 5 % človeški serum
- 2 - M2 - 10 % FBS
- 3- M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)
- 4 - M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)

Po tripsinizaciji in naselitvi hondrocytov v enaki gostoti kot v primarni kulturi (5.000 celic/ cm^2) se sama morfologija celic ni spremnjala. Za tripsinizacijo smo se odločili takrat, ko so se celice v mediju v katerem je bil prisoten LysexTM Premium, približale 80-90 % konfluenci. S tem smo želeli preprečiti nastajanje celičnih skupkov in posledično odlepljanje celic, saj so hondrocyti v mediju v katerem je bil prisoten LysexTM Premium, rastli hitreje kot v standardnem mediju (M1).



Slika 31: Konfluentna enoslojna kultura hondrocytov iz sklepnega hrustanca prve pasaže (P1) pod 100x povečavo

Legenda:

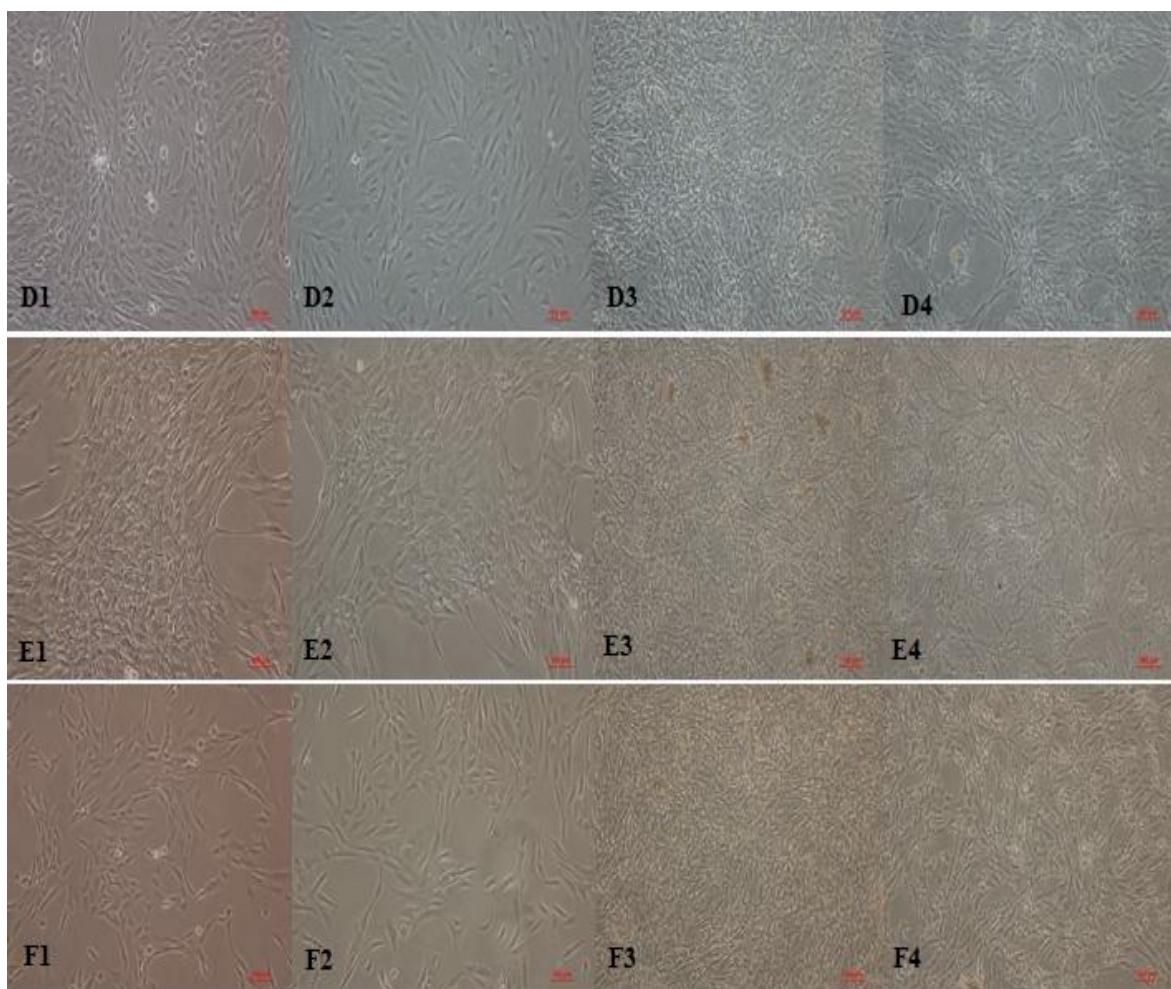
D1-D4-vzorec TP; E1-E4-vzorec BU; F1-F4-vzorec FM

1 - M1 - 5 % človeški serum

2 - M2 - 10 % FBS

3- M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

4 - M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 32: Konfluentna enoslojna kultura hondrocytov iz sklepnega hrustanca druge pasaže (P2) pod 100x povečavo

Legenda:

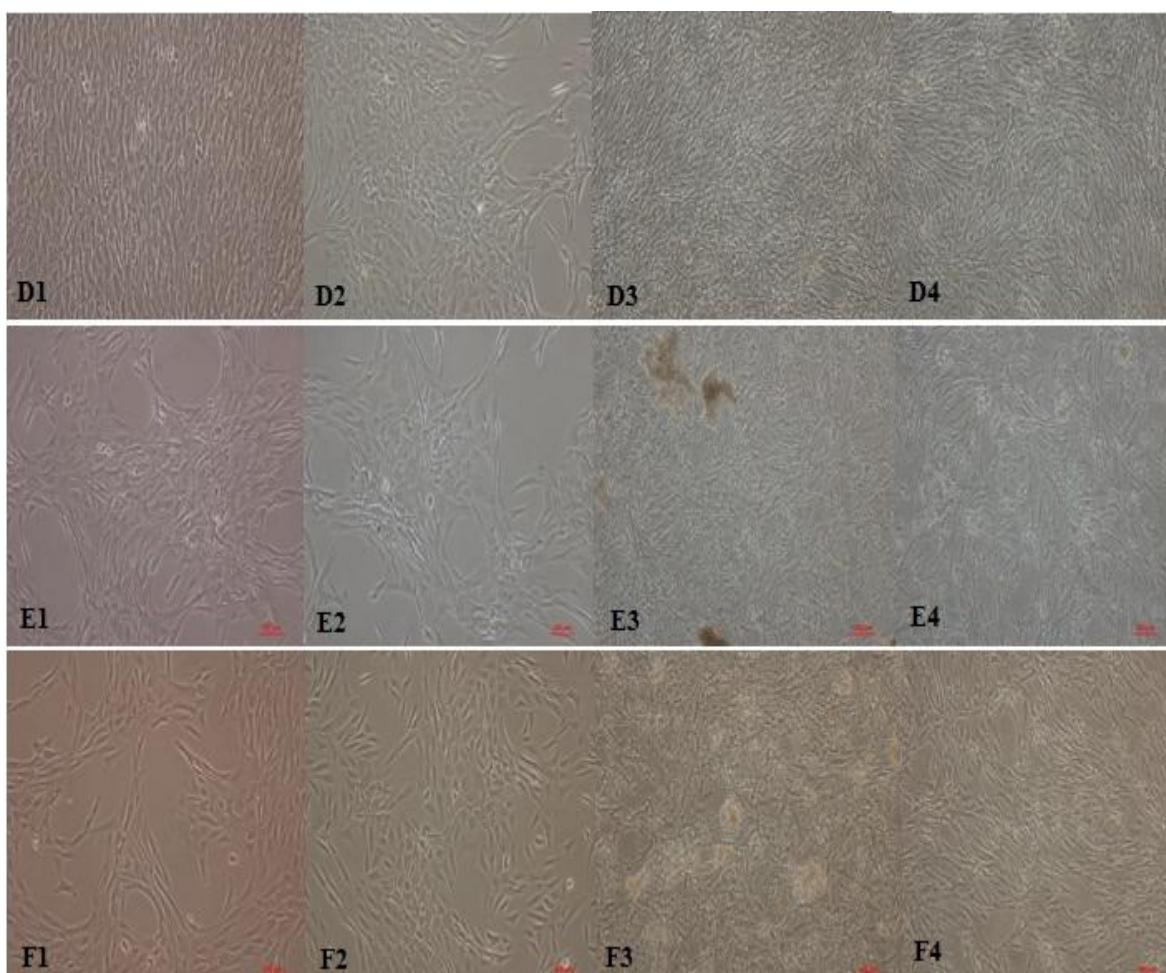
D1-D4-vzorec TP; E1-E4-vzorec BU; F1-F4-vzorec FM

1 - M1 - 5 % človeški serum

2 - M2 - 10 % FBS

3- M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

4 - M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 33: Konfluentna enoslojna kultura hondrocytov iz sklepnega hrustanca tretje pasaže (P3) pod 100x povečavo

Legenda:

D1-D4-vzorec TP; E1-E4-vzorec BU; F1-F4-vzorec FM

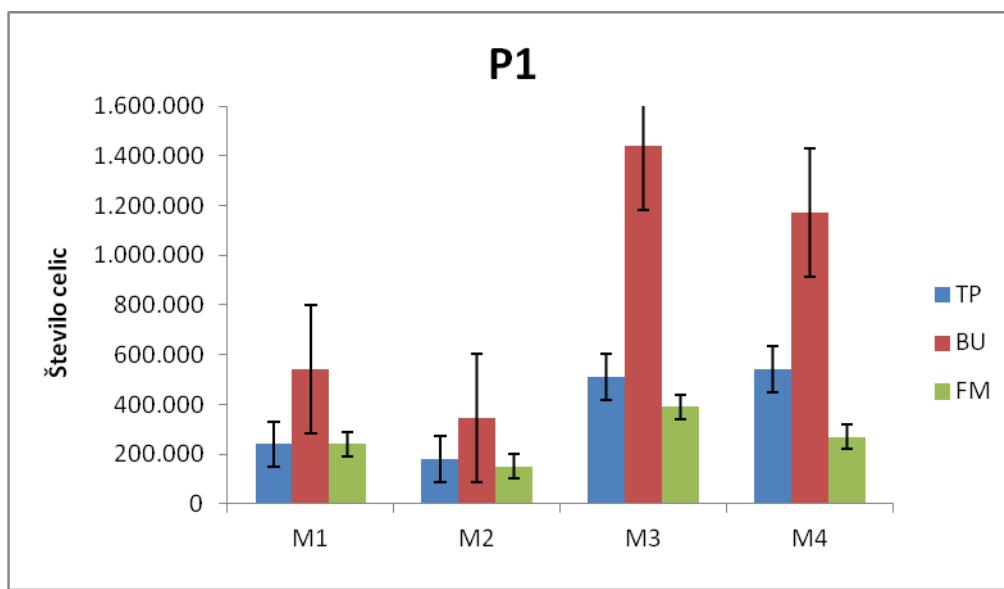
1 - M1 - 5 % človeški serum

2 - M2 - 10 % FBS

3- M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

4 - M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)

Rast celic v kulturah smo spremeljali s štetjem celic in ugotavljanju njihove živosti ob tripsinizaciji. Hondrocyte smo naselili v enaki gostoti v vseh 4 medijih. Njihovo rast smo spremeljali do 80-90 % konfluence, glede kulturo v mediju M1. Po tripsinizaciji smo število celic določali s štetjem s hemocitometrom. Na Slikah 34-36 so prikazana absolutna števila celic posameznih vzorcev v različnih medijih, in sicer v posameznih pasažah. Hondrocyti iz sklepnega hrustanca so v mediju v katerem je bil prisoten LysexTM Premium (M3 in M4) rastli hitreje v primerjavi s tistimi, gojenimi v M1 in M2.



Slika 34: Povprečne vrednosti števila hondrocytov iz sklepnega hrustanca v vseh treh vzorcih (TP, BU, FM) prve pasaže (P1), gojeni v posameznem mediju

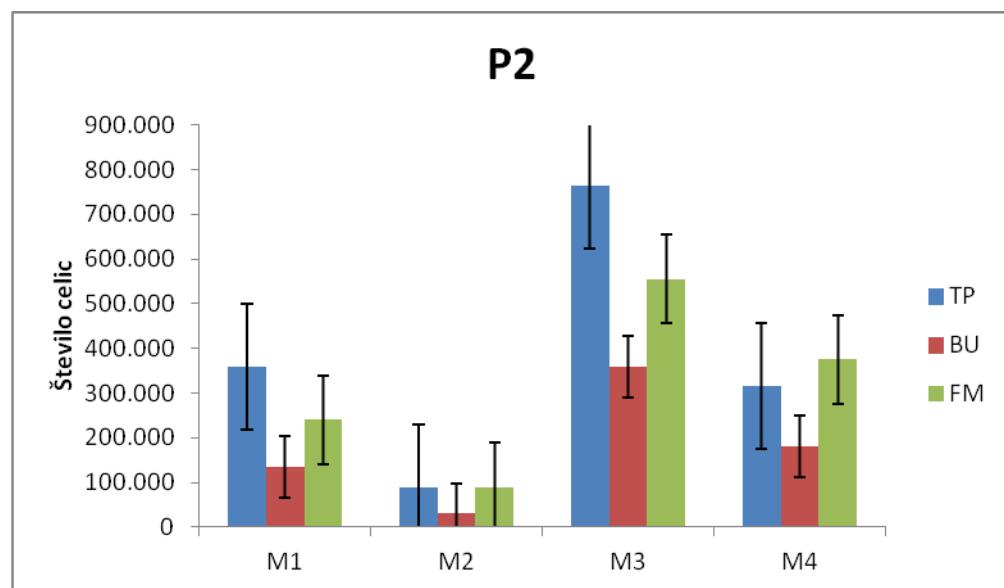
Legenda:

M1 - 5 % človeški serum

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 35: Povprečne vrednosti števila hondrocytov iz sklepnega hrustanca v vseh treh (TP, BU, FM) vzorcih druge pasaže (P2), gojeni v posameznem mediju

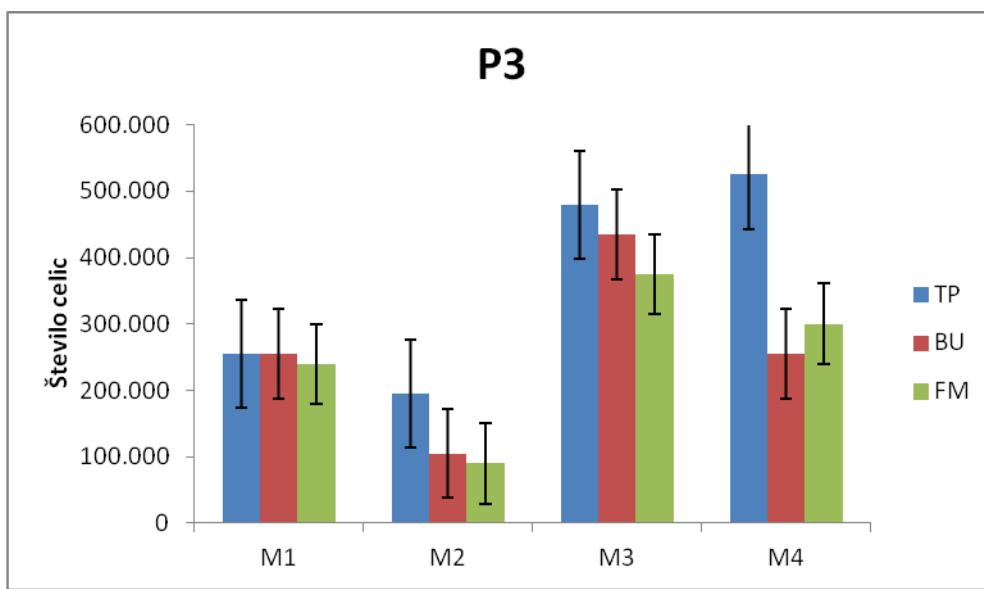
Legenda:

M1 - 5 % človeški serum

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 36: Povprečne vrednosti števila hondrocytov iz sklepnega hrustanca v vseh treh vzorcih (TP, BU, FM) tretje pasaže (P3), gojeni v posameznem mediju

Legenda:

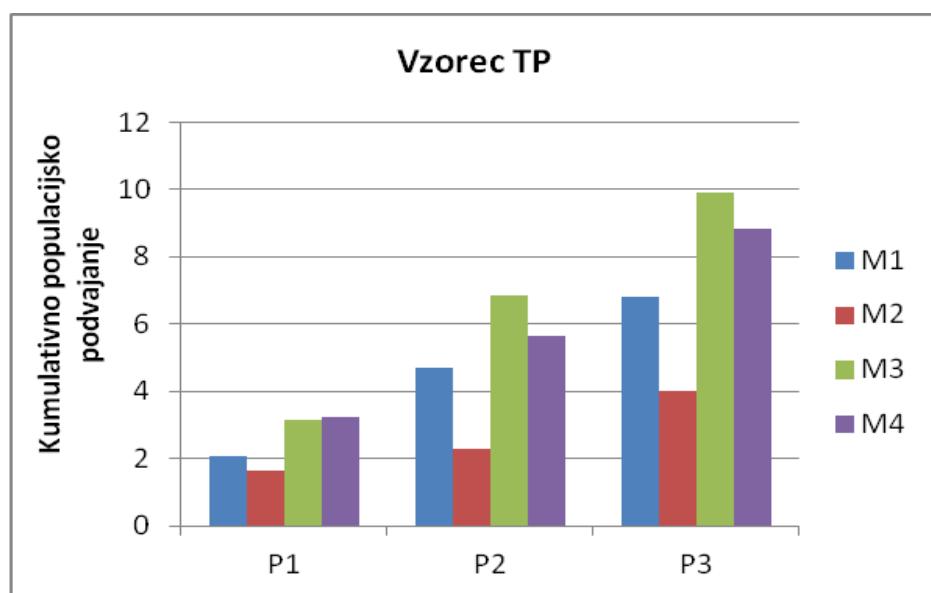
M1 - 5 % človeški serum

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)

Različni vzorci hondrocytov so se pomnoževali različno hitro. Rezultati izračunov njihovega kumulativnega populacijskega podvojevanja (KPD) s pomočjo enačb v poglavju 3.4.6 in 3.7 kažejo, da smo v primeru uporabe medijev M3 in M4 pridobili več celic kot v primeru uporabe M1 in M2, in sicer tekom vseh pasaž. V vseh treh preiskovanih vzorcih je bila KPD vrednost pri uporabi medijev M3 in M4 približno 9-10. Najnižje vrednosti smo izračunali za medij M2, in sicer približno 3. Vrednosti KPD v vzorcih, gojenih v 5 % človeškem serumu (M1) pa so se gibale okrog 6 (Slika 37-39).



Slika 37: Kumulativno populacijsko podvajanje (KPD) hondrocytov iz sklepnega hrustanca v vseh treh pasažah (P1, P2, P3) vzorca TP

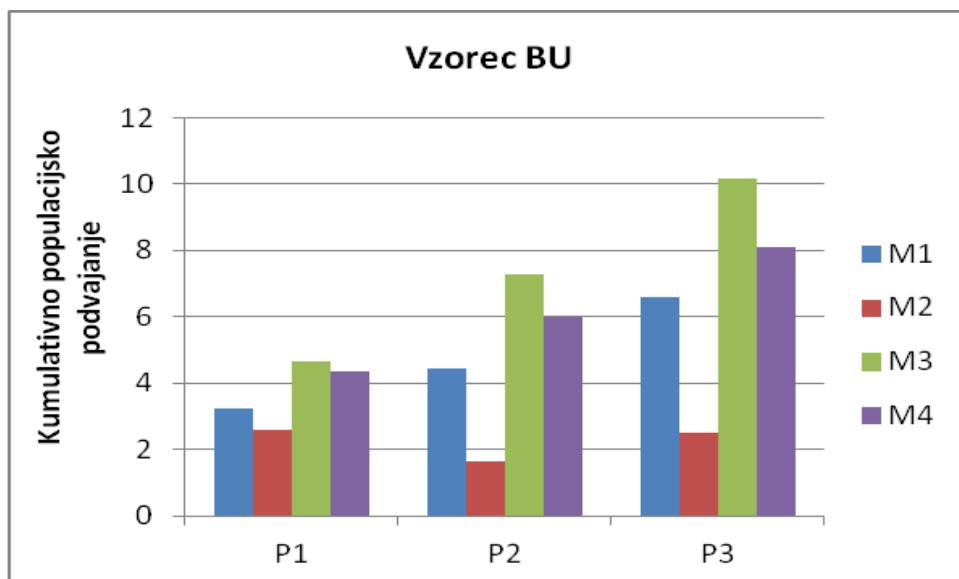
Legenda:

M1 - 5 % človeški serum

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 38: Kumulativno populacijsko podvajanje (KPD) hondrocytov iz sklepnega hrustanca v vseh treh pasažah (P1, P2, P3) vzorca BU

* V P2 je v primeru medija M2 vidno odstopanje, saj so se celice zelo slabo odlepiljale z dna gojilne plošče med tripsinizacijo; legenda je na naslednji strani.

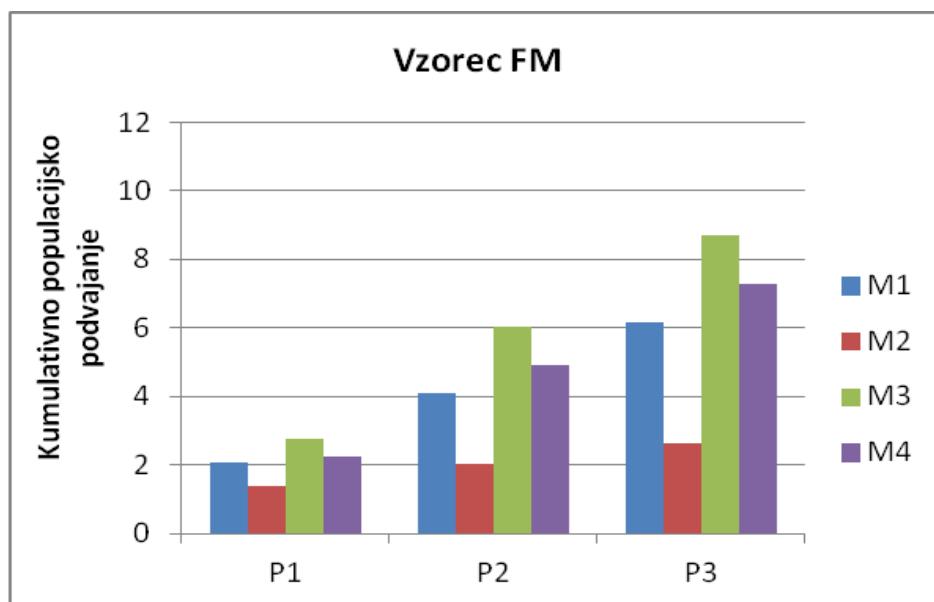
Legenda:

M1 - 5 % človeški serum

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 39 Kumulativno populacijsko podvajanje (KPD) hondrocytov iz sklepnega hrustanca v vseh treh pasažah (P1, P2, P3) vzorca FM

Legenda:

M1 - 5 % človeški serum

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)

4.2.2 Izražanje genov v hondroцитih iz sklepnega (hialinega) hrustanca, gojenih *in vitro*

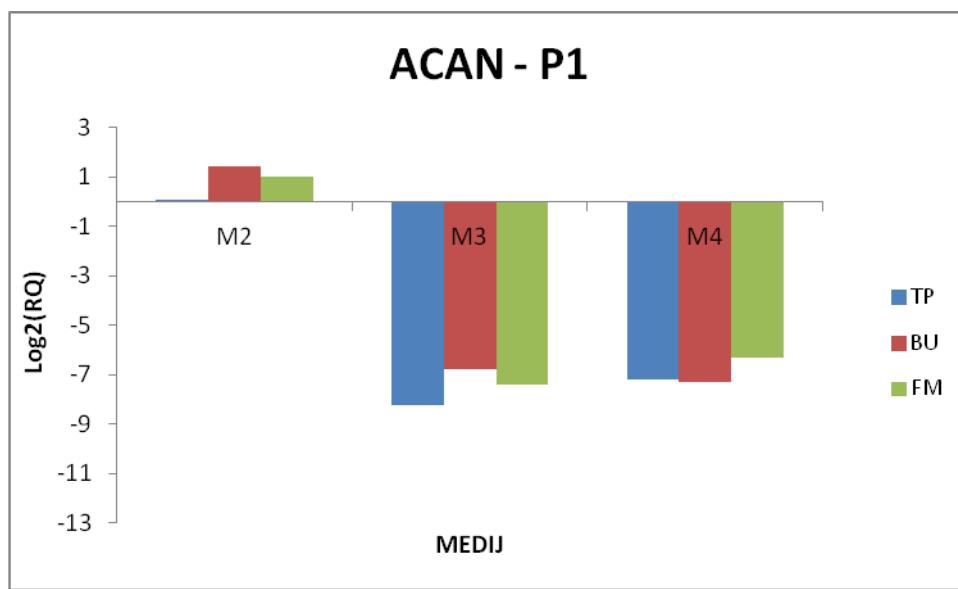
Iz hondrocytov iz sklepnega hrustanca smo po P1 in P3 izolirali celotno RNA in jo prepisali v cDNA (poglavlje 3.6). Izražanje genov v celicah smo analizirali z metodo verižnega pomnoževanja v realnem času (poglavlje 3.7). Zanimalo nas je tako izražanje genov, specifičnih za hialino hrustančno tkivo (COL II, ACAN) kot tudi genov, ki kodirajo gradbene enote fibroblastnega tipa hrustančnega tkiva (COL I in VCAN) ter dodatno še izražanje transkripcijskega dejavnika (SOX9).

Osnovno merilo za naše raziskave so predstavljali hondrocyti, gojeni v mediju M1 (človeški serum), ki smo jih uporabili za merjenje kvantitativnega izražanja genov.

Standard za izražanje preiskovanih genov pa je predstavljal gen b2M. Vse postopke smo izvedli enako kot pri analizi hondrocytov iz elastičnega hrustanca. Tudi relativne kvantifikacije, ki smo jih merili pri medijih M2, M3, M4, smo izračunali s pomočjo iste enačbe kot v primeru hondrocytov iz elastičnega hrustanca (poglavje 3.4.6).

Rezultate izražanja genov ACAN, COL2A1, COL1A1, ELN in SOX9 smo prikazali ločeno, za vsak gen posebej, in sicer za pasaži P1 in P3. Vsak set podatkov za posamezen gen sestavlja rezultati treh izbranih vzorcev hondrocytov. Na vseh slikah so prikazane vrednosti $\log_2(RQ)$ umerjene na uporabo medija M1. Kot biološko pomembne spremembe smo upoštevali razlike v izražanju, ki je bilo večje od 1, kar v linearni predstavitevi ustreza $2x$ sprememb. Vrednosti med 0 in 1 torej ne predstavljajo biološko pomembnih sprememb izražanja genov, kar pomeni, da so te vrednosti podobne tistim, ki smo jih določili pri uporabi medija M1.

Izražanje genov v treh namnoženih vzorcih celic, gojenih v štirih različnih medijih, različno (priloga C, Slika 40-47). Največjo razliko v izražanju genov, in sicer v razponu od 6-12 - kratno na \log_2 skali smo opazili v celicah, gojenih v medijih M3 in M4, in sicer v primeru agrekana (ACAN), pasaža P1 in P3 znižanje 100-4000 - kratno na linearni skali (Sliki 40 in 41). Kolagen tipa I (COL I) se je izražal podobno v vseh uporabljenih medijih tekom obeh spremljenih pasaž (Sliki 42 in 43). Pri izražanju transkripcijskega dejavnika SOX9 nismo zaznali večjih omembe vrednih razlik (slika 44-45). Porast nivoja izražanja gena za verzikan (VCAN) smo opazili le pri vzorcu FM, gojenim v mediju M4, in sicer v tretji pasaži (slika 46-47). Izražanje gena za kolagen tipa II (COL II) nismo zasledili niti pri P1, niti pri P3, in sicer v vseh hondrocytih, ki smo jih gojili v vseh 4 različnih gojiščih (priloga C).



Slika 40: Izražanje agrekana v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po prvi pasaži (P1), gojenih *in vitro*

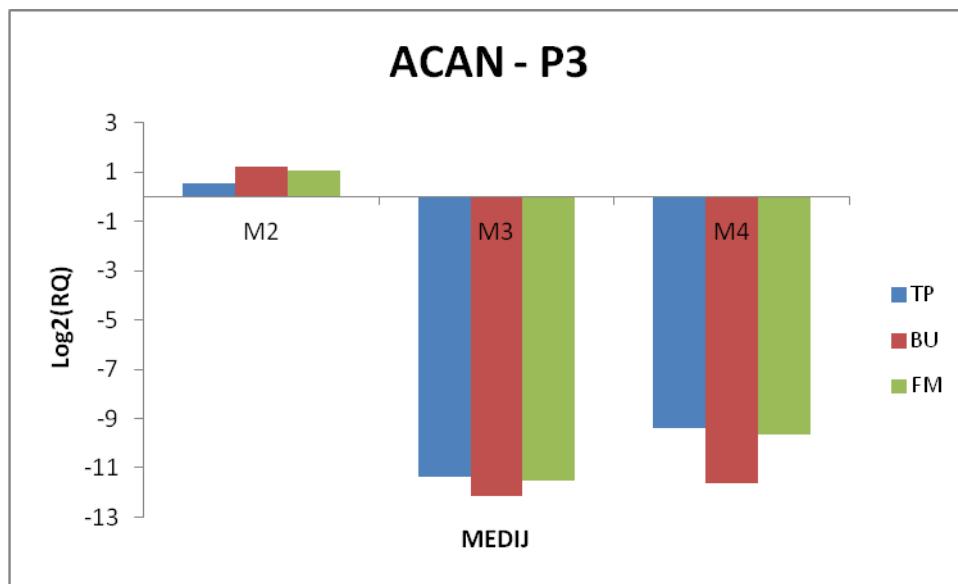
Legenda:

TP-oznaka vzorca 1; BU-oznaka vzorca 2; FM-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 41: Izražanje agrekana v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih *in vitro*

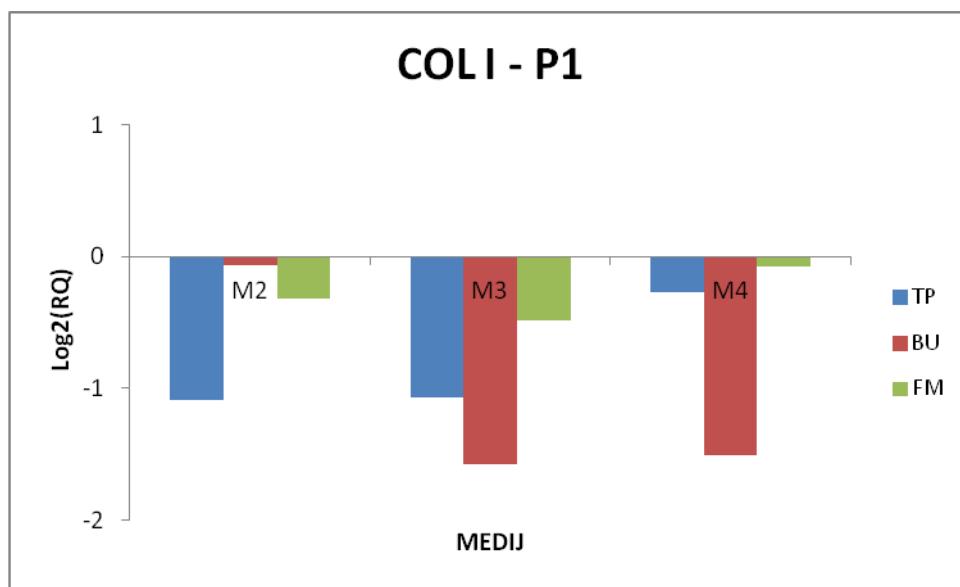
Legenda:

TP-oznaka vzorca 1; BU-oznaka vzorca 2; FM-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 42: Izražanje kolagena tipa I v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po prvi pasaži (P1) *in vitro*

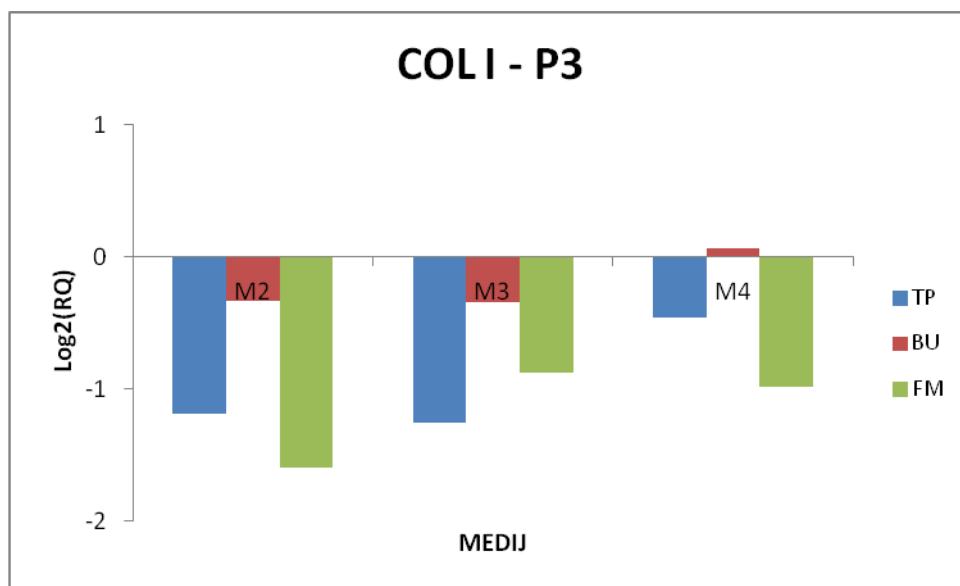
Legenda:

TP-oznaka vzorca 1; BU-oznaka vzorca 2; FM-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 43: Izražanje kolagena tipa I v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih *in vitro*

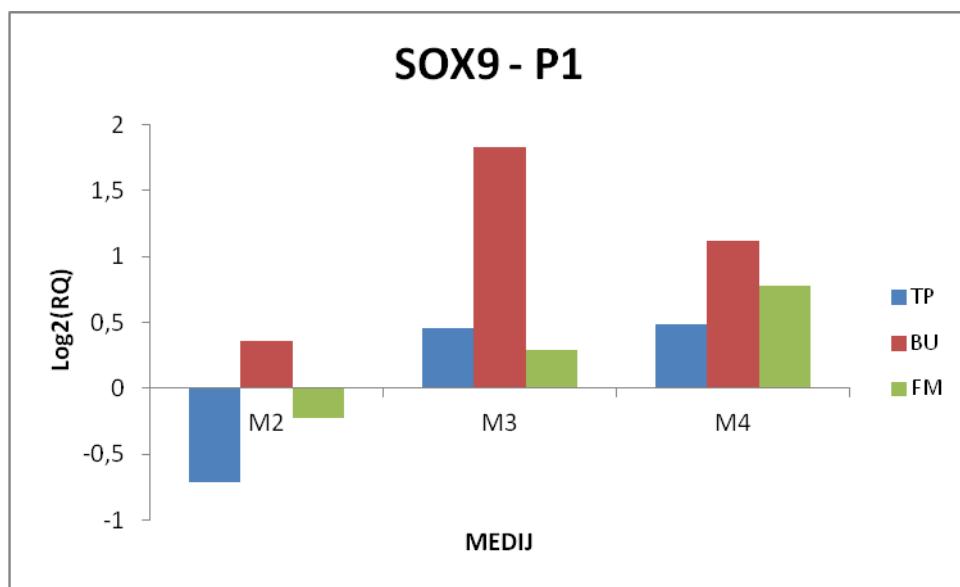
Legenda:

TP-oznaka vzorca 1; BU-oznaka vzorca 2; FM-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 44: Izražanje SOX9 v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po prvi pasaži (P1), gojenih *in vitro*

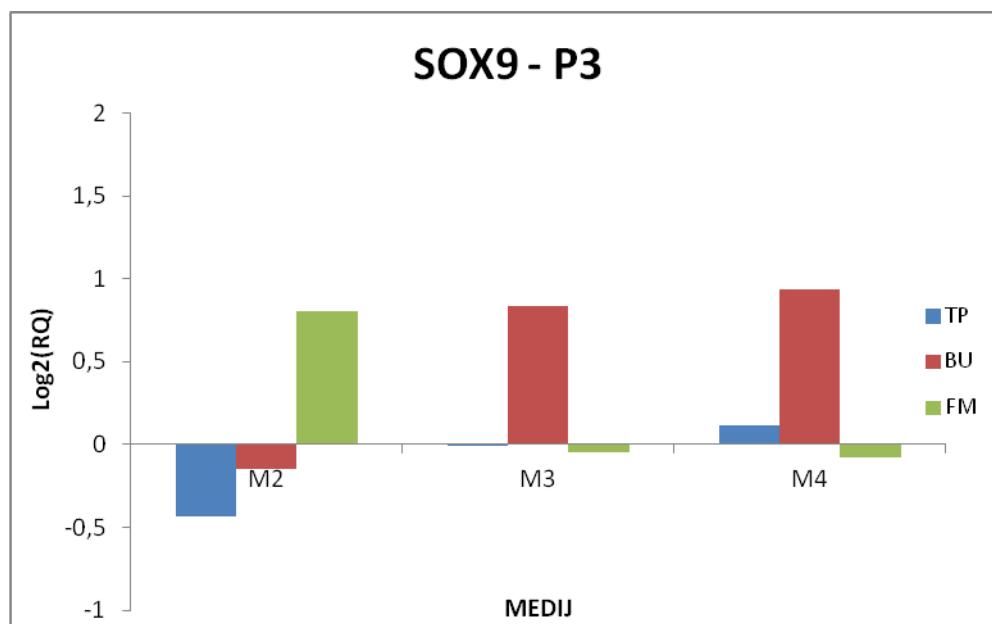
Legenda:

TP-oznaka vzorca 1; BU-oznaka vzorca 2; FM-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 45: Izražanje SOX9 v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih *in vitro*

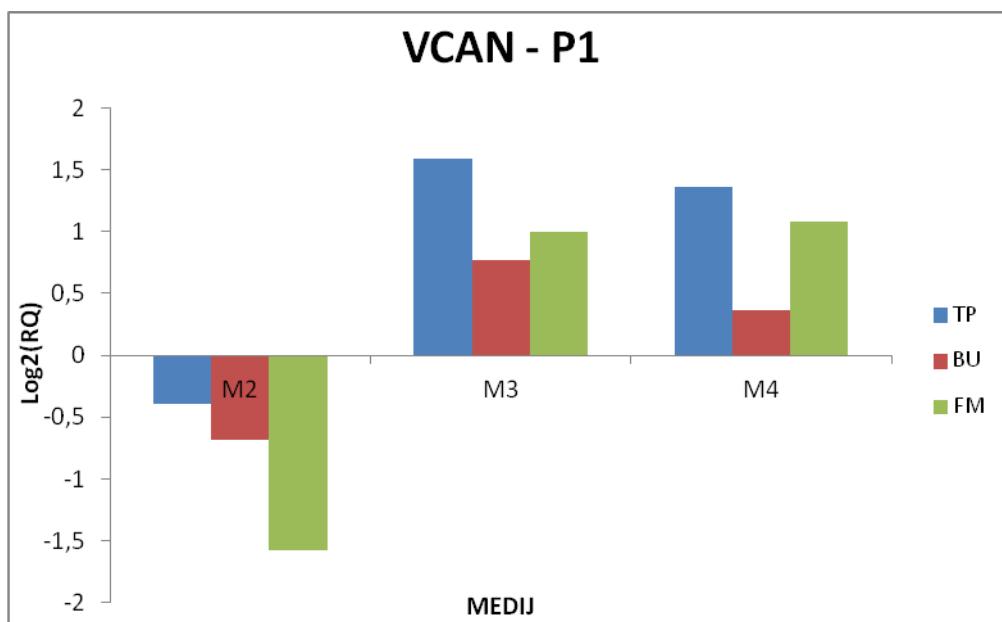
Legenda:

TP-oznaka vzorca 1; BU-oznaka vzorca 2; FM-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 46: Izražanje verzikana v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po prvi pasaži (P1), gojenih *in vitro*

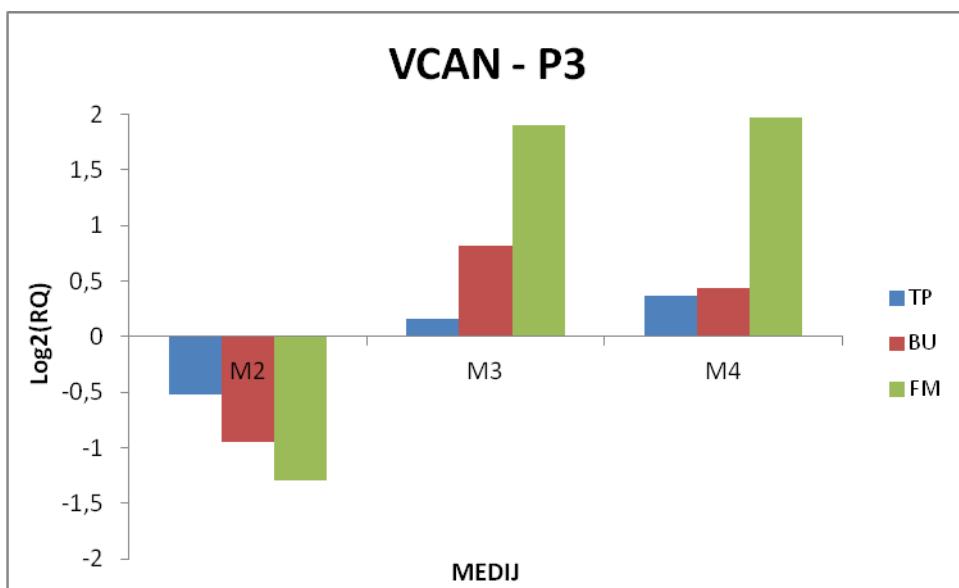
Legenda:

TP-oznaka vzorca 1; BU-oznaka vzorca 2; FM-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)



Slika 47: Izražanje verzikana v hondrocytih iz sklepnega hrustanca po tretji pasaži (P3), gojenih *in vitro*

Legenda:

TP-oznaka vzorca 1; BU-oznaka vzorca 2; FM-oznaka vzorca 3

M2 - 10 % FBS

M3 - 2,5% LysexTM (PRP) + 2,5% Lysex Active DiluentTM (PPP)

M4 - 1 % LysexTM (PRP) + 4 % Lysex Active DiluentTM (PPP)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 MORFOLOGIJA IN RAST CELIC

Morfološke lastnosti obeh vrst hrustančnih celic po gojenju v enoslojnih kulturah v štiri različnih medijih smo ugotavljali z opazovanjem oblike celic pod invertnim svetlobnim mikroskopom, saj je znano, da sprememba oblike iz kroglaste v vretenasto nakazuje na njihovo dediferenciacijo.

Pri obeh vrstah hondrocytov, ki smo jih gojili v mediju z dodatkom lizata trombocitov *LysexTM Premium*, smo že drugi dan po njihovi naselitvi v vdolbine gojilne plošče opazili spremembo v vretenasto fibroblastno obliko, kar je zelo pogosto pojav pri celicah gojenih v enoslojni kulti. Ta sprememba je bila prav tako prisotna tudi v primerih uporabe medija 1 in medija 2. Če povzamemo, so se hondrocyti v prisotnosti *LysexTM Premium* v začetni fazi gojenja obnašali podobno kot tisti v mediju s človeškim serumom in FBS. Razlike v obliki celic gojenih v mediju z dodatkom *LysexTM Premium* so se začele pojavljati v kasnejših fazah rasti, in sicer zaradi njihove hitrejše proliferacije. Obe vrsti hondrocytov sta namnožene v teh pogojih pridobile nekoliko drugačno morfologijo kot istovrstne celice gojene v prisotnosti človeškega serumca in FBS. Celice so postale ožje in še bolj podolgovate. Zaradi slabšega pritrjevanja so se hondrocyti, gojeni v mediju z dodatkom *LysexTM Premium* tudi hitreje odlepljale, kar smo pod mikroskopom zaznali v obliki rjavih skupkov. Slabše pritrjevanje bi lahko bila posledica pomanjkanja sestavin, ki so prisotne v serumu, ni pa jih v *LysexTM Premium* lizatu trombocitov.

Število živih celic, gojenih v medijih, smo določili z metodo barvanja s tripanskim modriliom in s štetjem v hemocitometru. Gojenje hondrocytov iz elastičnega in sklepnega hrustanca 1D je bilo zelo uspešno ob uporabi medija, ki smo mu dodali lizat trombocitov *LysexTM Premium*. Ta je uspenejše stimuliral rast celic, kot mediji, kjer je bil prisoten človeški serum ali FBS. To lahko pripišemo številnim rastnim dejavnikom, kot so PDGF, TGF-β, IGF, VEGF, FGF-2/bFGF, HGF, EGF, ki so prisotni v lizatu trombocitov *LysexTM Premium*. Podobno kot mi, so tudi Pereira in sod. (2013) ugotovili, da hondrocyti iz sklepnega hrustanca, gojeni v lizatu trombocitov pridobijo podolgovato fibroblastno obliko in ohranijo visoko stopnjo proliferacije v kulti.

5.2 IZRAŽANJE GENOV

Za proces hondrocytne dediferenciacije je značilno zmanjšano izražanje genov značilnih za hrustančno tkivo (COL II, ACAN) ter povečano izražanje genov, specifičnih za fibroznji tip hrustanca (COL I in VCAN). Splošno znano je, da se hondrocyti po izolaciji in gojenju *in vitro* dediferencirajo v fibroblastom podobne celice, ki so značilne za fibroznji tip

hrustanca. Tovrstne celice, gojene v enoslojnih kulturah torej spremenijo svoje morfološke in fenotipske lastnosti (Goldring M.B., 2012; Meyer in sod., 2009).

Pri analizi RT-qPCR smo se odločili za preverjanje izražanja različnih genov. Za vrednotenje lastnosti obeh vrst hrustančnega tkiva smo izbrali gene: COL II, COL I, ACAN, VCAN in SOX9. Specifični gen hondrocytov iz elastičnega hrustanca je elastin (ELN), ki temu tkivu daje elastičnost in prožnost. Specifični gen hondrocytov iz sklepnegata je kolagen tipa II (COL II), ki daje hrustancu natezno trdnost in struktorno obliko (Štrus, 2002). Žeeli smo spremljati stopnjo dediferenciacije v različnih medijih tekom pasažiranja. Pričakovali smo znižan nivo kolagena II, agrekana, elastina in SOX9 v medijih M3 in M4, ob tem pa zvišanje kolagena tipa I.

Rezultati naše analize RT-qPCR kažejo, da je v obeh vrstah hondrocytov gojenih v štirih različnih medijih prišlo do sprememb v izražanju izbranih genov, ki kažejo na njihovo dediferenciacijo. Pri hondrocytih iz elastičnega hrustanca, gojenih v prisotnosti *Lysex™ Premium* se je najopaznejše znižalo izražanje elastina, do katerega je prišlo že v P1 in se je ohranilo tudi v P3. Glede na dokaj konstantno izražanje transkripcijskega dejavnika SOX9, ki skrbi za nastanek nekaterih proteinov in proizvodnjo efektorskih molekul, lahko sklepamo, da so hondrocyti gojeni v mediju z lizatom trombocitov *Lysex™ Premium* ohranili svoj naravni somatski spomin, kar so ugotovili tudi Pereira in sod. (2013). Verjetno je, da celice gojene v prisotnosti *Lysex™ Premium* ves metabolizem oz. vso svojo »mehanizacijo« usmerijo le v podvojevanje in so zato specifični geni za diferencirane, zrele hondrocyte neizraženi. Takšni rezultati so posledica edinstvene vsebnosti aktivnih komponent trombocitnega lizata *Lysex™ Premium*. To so rastni dejavniki, in sicer PDGF, TGF-β, IGF, VEGF, FGF-2/bFGF, HGF in EGF. Zaključimo lahko, da so imele celice, ki smo jih gojili v prisotnosti *Lysex™ Premium* zaradi izjemno stimulirane proliferacije še nekoliko »slabši« fenotip kot tiste, gojene v človeškem serumu ali v FBS. Vendar pa iz pridobljenih rezultatov genskega izražanja ne moremo narediti zaključka glede primernosti/neprimernosti uporabe *Lysex™ Premium* za gojenje hondrocytov v klinične namene. Da bi preverili biološki pomen teh rezultatov bi namreč morali celice naseliti v izbirno 3D okolje in opazovati njihovo sposobnost rediferenciacije.

Do sedaj je bila uporaba hrustančnih celic velikokrat omejena s tkivnim izvorom, starostjo bolnika, ali zaradi nizkega izhodnega števila celic, po izolaciji iz zdravega tkiva. Glede na naše rezultate pa predpostavljam, da bo trombocitni lizat *Lysex™ Premium*, ki ga za zdaj še ni na tržišču, dobil ustrezno mesto v izdelavi pripravkov za celične terapije, saj se je izkazalo, da so hrustančne celice gojene v njeni prisotnosti zmožne boljše proliferacije kot tiste, ki rastejo v standardnem gojitvenem mediju. Uporaba lizata trombocitov *Lysex™ Premium* kot dodatka v medij bi torej v prihodnosti lahko omogočila zdravljenje s celičnimi terapijami tudi pri tistih bolnikih, ki jim je bilo to do sedaj onemogočeno. Menimo, da bi bilo *Lysex™ Premium* smiselnou uporabiti tudi za gojenje hondrocytov,

namenjenih za terapevtsko zdravljenje, ali v primeru, da bi se v 3D okolju dobro rediferencirali.

5.3 SKLEPI

- Hondrocyti iz elastičnega in sklepnega hrustanca so rastli najhitreje v mediju z dodatkom lizata trombocitov *LysexaTM Premium*.
- Med obema testiranimi koncentracijama *LysexaTM Premium* v mediju se je najbolj obnesla tista z 2,5 % PL in 2,5 % PPP, saj je bila celična gostota obeh vrst hondrocytov v tem primeru največja.
- Za gojenje celic v terapevtske namene bi bila bolj primerna uporaba razmerja 1 % PL in 4 % PPP, pri katerem je bila proliferacija še zmeraj dobra, celice pa so se z gojilne podlage odlepljale v manjšem obsegu.
- Kljub večji vsebnosti rastnega dejavnika TGF-β v medijih 3 in 4, v katerih je bil prisoten lizat trombocitov *LysexaTM Premium*, hondrocytni fenotip v enoslojni kulturi ni bil manj dediferenciran.
- Z analizo izražanja specifičnih genov smo dokazali spremembe v izražanju izbranih genov v celicah gojenih v medijih M3 in M4, kar kaže na dodatno dediferenciacijo hondrocytov.
- Kljub dokazanim ugodnim vplivom lizata trombocitov na rast človeških hondrocytov *in vitro*, bo v prihodnosti potrebno opraviti še natančnejše analize ter preveriti ali tako predhodno namnožene celice v 3D gelu lahko ohranijo zmožnost rediferenciacije.

6 POVZETEK

V magistrski nalogi smo želeli ugotoviti vpliv lizata trombocitov *LysexTM Premium* na rast in diferenciacijo hondrocytov iz elastičnega in sklepnega hrustanca v enoslojnih kulturah *in vitro*. Ugotovili smo, da je uporaben pri razvoju novih celičnih terapij, ker predstavlja potencialno dober nadomestek serumu. Celicam namreč zagotavlja vse potrebno za rast in razmnoževanje v kulturi. Poskuse smo opravili s po tremi biološkimi vzorci hondrocytov iz elastičnega in sklepnega hrustanca. Celice smo odtajali in jih v enakih gostotah naselili v enoslojne kulture v 4 različnih medijih. Prvi medij M1 je vseboval 5 % človeški serum, drugi 10 % FBS, tretji in četrti pa različni koncentraciji lizata trombocitov *LysexTM Premium*. Ko so hondrocyti v kulturah dosegli skoraj 80-90 % konfluenco v mediju 3, smo jih tripsinizirali, celice prešteli in naselili v novo gojilno posodo. Enako smo storili tudi s preostalimi celicami, gojenimi v medijih 1, 2 in 4. Hondrocyte smo gojili najprej in jih ponovno prenesli v drugo, nato pa še v tretjo pasažo. Celično rast in morfologijo smo spremljali pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Analizirali smo tudi izražanje genov, značilnih za hondrocyte iz elastičnega hrustanca (ELN) in tistih značilnih za celice iz sklepnega hrustanca (COL II, ACAN). Po prvi in tretji pasaži smo iz celic izolirali celotno RNA, jo prepisali v cDNA in izražanje genov analizirali z metodo RT-qPCR. Rezultate smo statistično ovrednotiti in določili razlike v nivojih izražanja preiskovanih genov. Morfologija obeh vrst hondrocytov se je med gojenjem v enoslojnih kulturah v mediju z dodatkom lizata trombocitov *LysexTM Premium* ni bistveno spremenila. Tekom vseh treh pasaž so namreč v teh pogojih hondrocyti obdržali podolgovato, fibroblastom podobno obliko. Obe vrsti hondrocytov so v mediju z lizatom trombocitov *LysexTM Premium* rastli veliko hitreje kot istovrstne celice v prisotnosti človeškega serumu in FBS. Zaradi velike gostote so se hondrocyti obeh vrst začeli odlepljati od rastne podlage in tvoriti skupke. Izražanje specifičnih genov v celicah, gojenih v mediju z dodatkom lizata trombocitov *LysexTM Premium* kaže na dodatno dediferenciacijo, in sicer prav zaradi stimulirane proliferacije. Ali bi se tako namnoženim hondrocytom iz elastičnega in sklepnega hrustanca, med gojenjem v 3D okolju povrnil hrustančni fenotip (rediferenciacija), pa bo potrebno v prihodnosti še preveriti.

7 VIRI

- Adolphe M., Benja P. 1996. Different types of cultured chondrocytes-the in vitro approach to the study of biological regulation. In: Biological regulation of the chondrocytes. Adolphe M (ed.). Boca Raton, CRC Press: 105-139
- Ahmed N., Gan L., Nagy A., Zheng J., Wang C., Kandel R. A. 2009. Cartilage tissue formation using redifferentiated assaged chondrocytes *In vitro*. *Tissue Engineering*, 15, 3: 665-673
- Anderer U., Libera J. 2002. *In vitro* engineering of human autogenous cartilage. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17, 8: 1420-1429
- Barlič A., Maličev E. 2008. Zdravljenje poškodovanega sklepnega hrustanca. *Zdravstveni vestnik*, 77: 141–144
- Bieback K. 2013. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 5, 40: 326-335
- Boost your cell culture today for the experiments of tomorrow. 2013. Pian dei Mori, Sclavo Diagnostics International: 2 str. (predstavitveni letak)
- Borzini P., Mazzucco I. 2007. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet derivatives for topical therapy. What is true from the biologic view point. *ISBT Science Series*, 2: 272-281
- Brittberg M., Peterson L., Sjouml;gren-Jansson E., Tallheden T., Lindahl A., 2003. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 3, 85: 109-115
- Cristoralo V.J., Allen R.G., Pignolo R.J., Martin B.G., Beck J.C. 1998. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Cell Biology*, 95: 10614-10619
- De Vries-van Melle M.L., Mandl E.W., Kops N., Koevoet W.J.L.M., Verhaar J.A.N., van Osch G.J.V.M. 2012. An osteochondral culture model to study mechanisms involved in articular cartilage repair. *Tissue Engineering*, 18, 1: 45-53
- Dragin Jerman U., Erdani Kreft M. 2012. Od tkivnega inženirstva do regenerativne medicine – sodoben pristop k rekonstrukciji sečil. *Zdravstveni vestnik*, 81: 735–44

Gan L., Kandel R.A . 2007. *In vitro* cartilage tissue formation by co-culture of primary and passaged chondrocytes. *Tissue Engineering*, 13, 4: 831-842

Giannoni P., Cancedda R. 2006. Articular chondrocytes culturing for cell-based cartilage repair: needs and perspectives. *Cell Tissue Organs*, 184:1-15

Gikas P.D., Bayliss L., Bentley G., Briggs T.W.R. 2009. An overview of autologous chondrocyte implantation. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 91-B, 8:997-1016

Genetic home reference. 2014. Rockville Pike, US National library of medicine
<http://ghr.nlm.nih.gov/BrowseGenes> (avgust)

Goldring M.B. 2012. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 4, 4: 269-285

Gonzales V.K., De Mulder E.L., de Boer T., Hannink G., van Tienen T.G., van Heerde W.L., Buma P. 2013. Platelet-rich plasma can replace fetal bovine serum in human meniscus cell cultures. *Tissue Engineering Part C Methods*, 19, 11: 892-899

Hongshuai L., Arvydas U., Minakshi P., Chien-Wen C., Thompso S., Ahani B., Cummins J., Lavasan M., Huard J. 2013. Platelet-rich plasma promotes the proliferation of human muscle derived progenitor cells and maintains their stemness. *PLOS One*, 8, 6: e64923,doi: 10.1371/journal.pone.0064923:12 str.

Jeras M. 2007. Celično in tkivno inženirstvo. V: Biološka zdravila:od gena do učinkovine. 1. izd. Štrukelj B in Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 647-649

Li T-F., O'Keefe R.J., Chen D. 2005. TGF- β Signaling in chondrocytes. *Frontiers in bioscience*,10: 681-688

Lin Z., Willers C., Xu J., Zheng M-H. 2006. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Enginnering*, 12, 7: 1971-1983

LysexTMPremium. 2013. Cell culture supplement. Techical data sheet. Pian dei Mori, Sclavo Diagnostic International: 1 str.

Mallein-Gerin F., Garrone R., Van der Rest M. 1991. Proteoglycan and collagen synthesis are correlated with actin organization in dedifferentiating chondrocytes. *European Journal of Cell Biology*, 65, 2: 264-333

Mandl E.W., Van der Veen S.W., Verhaar J.A.N., Van Osch J.V.M. 2004. Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity. *Tissue Engineering*, 10, 1/2: 109-118

Marijnissen W.J., Van Osch G.J., Aigner J., Verwoerd-Verhoef H.L., Verhaar J.A. 2000. Tissue engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. *Biomaterials*, 21, 6: 571-580

Masuda K., Sah R.L. 2006. Tissue engineering of articular cartilage. V: Culture of cells for tissue engineering. Vunjak-Novaković G., Freshney R.I. (eds). New Jersey, Wiley-Liss: 157-190

Meyer U., Handschel J., Wiesmann H. P., Meyer T. 2009. Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine. Berlin, Springer: 910 str.

Muraglia A., Ottonello C., Spano R., Dozin B., Strada P., Grandizio M., Cancedda R., Mastrogiamomo M. 2014. Biological activity of a standardized freeze-dried platelet derivative to be used as cell culture medium supplement. *Platelets*, 25,3: 211-220

Narandža J., Vogrin M. 2013. Tkivno inženirstvo pri zdravljenju hrustančnih poškodb. *Zdravniški vestnik*, 82 : 686–694

Pereira R. C., Scaranari M., Benelli R., Strada P., Reis R.L., Cancedda R., Gentili C. 2013. Dual effect of platelet lysate on human articular cartilage:a maintenance of chondrogenic potential and a transient proinflammatory activity followed by an inflammation resolution. *Tissue Engineering*, 19,11 SUPPL. 12: 1476-1489

Radosavljević D., Drobnič M., Gorenšek M., Koritnik B., Kregar Velikonja N., Maličev E., Jeras M., Knežević M. 2003. Operativno zdravljenje okvar sklepnega hrustanca v kolenu. *Surgical Treatment of the Knee Cartilage Lesions*, 42: 47-57

Rožman P., Jež M. 2009. Matična celica in napredno zdravljenje (napredno zdravljenje s celicami, genska terapija in tkivno inženirstvo) - Slovar. Ljubljana, Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije: 29 str.
http://www.ztm.si/uploads/pdf_datoteke/gradiva/Slovarcek_MC-3227.pdf (avgust 2014)

Sandell L.J., Adler P. 1999. Developmental patterns of cartilage. *Frontiers in Bioscience*, 4: D731-D742

Steward M.C., Saunders K.M., Burton-Wurster N., Macleod J.N. 2000. Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *Journal of Bone and Mineralization Research*, 15, 1:166-174

Stokes D.G., Liu G., Dharmavaram R., Hawkins D., Sonsoles Piera-Velazquez S., Jimenez S.A. 2001. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biocemical Journal*, 360: 461-470

Slanc P. 2007. Genska informacija in kako do nje. V: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. 1. izd. Štrukelj B. in Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 55-58

Štrus J. 2002. Navodila za vaje iz splošne zoologije 1. del. 2. popravljena izd. Ljubljana, Študentska založba: 79 str.

Tissue Engeneering Terminology. 2014. San Francisco, Quizlet
<http://quizlet.com/19461889/tissue-engineering-terminology-flash-cards/> (avgust)

Tkvino inženirska metoda za zdravljenje vezikoureteralnega refluksa. 2014. Ljubljana, Educell d.o.o.
<http://www.educell.si/celicni-izdelki/uroart-65588> (avgust 2014)

Van Osch G.J.V.M., Brittberg M., Dennis J.E., Bastiaansen-Jenniskens Y.M., Erben R.G., Konttinen Y.T., Luyten F.P. 2009. Cartilage repair: past and future-lessons for regenerative medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13, 5: 792-810

Velikonja N.K., Wozniak G., Malicev E., Knezevic M., Jeras M. 2001. Protein synthesis of human articular chondrocytes cultured *in vitro* for autologous transplantation. *Pflugers Archive*, 442, 6, SUPPL. 1: R169-R170

Vunjak-Novaković G. 2006. Tissue engineering: basic considerations. V: Culture of cells for Tissue Engineering. Vunjak-Novaković G., Freshney R.I. (eds). Hoboken, Wiley-Liss :131-156

ZAHVALA

Za pomoč pri izdelavi magistrske naloge se iskreno zahvaljujem somentorici dr. Ariani Barlič, ki mi je nudila znanje in podporo. Zahvaljujem se tudi mentorju dr. Miomirju Kneževiču za vse nasvete.

Posebna zahvala gre tudi Barbari Dovgan univ. dipl. biokem. in Urški Potočar univ. dipl. bioteh., ki sta mi s svojimi nasveti, spodbudami in navodili pomagali pri praktičnem delu magistrske naloge v laboratoriju.

Nazadnje se zahvaljujem tudi staršema, sestrama in fantu za vso podporo.

PRILOGE

Priloga A: Podatki za umeritveni krivulji genov b2M in ELN

b2M			
	povprečna vrednost Ct	količina	log količine
1x	21,323075	100	2
10x	24,870669	10	1
100x	28,646263	1	0
1000x	32,791412	0,1	-1
10000x	35,411971	0,01	-2
	povprečna vrednost Ct	količina	log količine
1x	21,394315	100	2
10x	24,798746	10	1
100x	28,535722	1	0
1000x	32,485764	0,1	-1
10000x		0,01	-2
ELASTIN			
	povprečna vrednost Ct	količina	log količine
1x	19,667350	100	2
10x	23,587580	10	1
100x	27,017259	1	0
1000x	31,182794	0,1	-1
10000x	34,430969	0,01	-2
	povprečna vrednost Ct	količina	log količine
1x	21,205070	100	2
10x	25,319112	10	1
100x	28,681789	1	0
1000x	32,389349	0,1	-1
10000x		0,01	-2

*b2M je komercialno ime za $\beta 2$ mikroglobulin

Priloga B:

Priloga B: Vrednosti Log₂(RQ) za elastični hrustanec, umerjene na M1 (5 % človeški serum)

	AGCN	Col1	Col2	ELN	SOX9
PB,P1,M1					
PB,P1,M2	1,65	-0,57	1,52	0,73	0,64
PB,P1,M3	0,44	-1,05	1,69	-2,40	0,79
PB,P1,M4	-0,47	-1,27	-1,13	-2,90	0,16
PB,P3,M1					
PB,P3,M2	1,47	-0,06	nd	1,85	-0,39
PB,P3,M3	-4,37	-0,75	nd	-2,77	-0,28
PB,P3,M4	-3,52	-0,69	nd	-2,35	0,15
KL,P1,M1					
KL,P1,M2	1,36	-0,83	1,09	-0,27	0,97
KL,P1,M3	1,77	-1,59	1,31	-3,31	2,53
KL,P1,M4	-0,98	-1,56	-0,50	-4,46	0,27
KL,P3,M1					
KL,P3,M2	0,91	-0,65	nd	0,33	0,53
KL,P3,M3	-2,81	-0,03	nd	-2,23	0,24
KL,P3,M4	-4,72	-0,17	nd	-1,24	-1,75
NN,P1,M1					
NN,P1,M2	0,88	-1,03	2,44	0,83	0,62
NN,P1,M3	-0,80	-0,36	3,19	-1,74	-0,06
NN,P1,M4	-0,46	-0,14	3,53	-1,35	0,56
NN,P3,M1					
NN,P3,M2	2,01	-0,77	nd	0,91	0,36
NN,P3,M3	-2,91	-0,58	nd	-2,45	-0,85
NN,P3,M4	-3,32	-0,10	nd	-1,06	-0,52

Priloga C

Priloga C: Vrednosti Log₂(RQ) za sklepni (hialini) hrustanec, umerjeno na M1 (5 % človeški serum)

	AGCN	Col1	Col2	VCAN	SOX9
TP,P1,M2					
TP,P1,M2	0,02	-1,09	nd	-0,40	-0,72
TP,P1,M3	-8,26	-1,07	nd	1,59	0,46
TP,P1,M4	-7,22	-0,27	nd	1,37	0,49
TP,P3,M1					
TP,P3,M2	0,55	-1,19	nd	-0,52	-0,44
TP,P3,M3	-11,39	-1,25	nd	0,16	-0,01
TP,P3,M4	-9,41	-0,46	nd	0,37	0,11
BU,P1,M1					
BU,P1,M2	1,42	-0,07	nd	-0,69	0,36
BU,P1,M3	-6,77	-1,57	nd	0,77	1,83
BU,P1,M4	-7,32	-1,51	nd	0,36	1,12
BU,P3,M1					
BU,P3,M2	1,22	-0,33	nd	-0,94	-0,15
BU,P3,M3	-12,17	-0,34	nd	0,82	0,84
BU,P3,M4	-11,65	0,06	nd	0,44	0,94
FM,P1,M1					
FM,P1,M2	1,01	-0,32	nd	-1,58	0,62
FM,P1,M3	-7,41	-0,48	nd	0,99	-0,06
FM,P1,M4	-6,30	-0,08	nd	1,08	0,56
FM,P3,M1					
FM,P3,M2	1,04	-1,59	nd	-1,29	0,80
FM,P3,M3	-11,53	-0,87	nd	1,90	-0,05
FM,P3,M4	-9,63	-0,98	nd	1,97	-0,08