

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Vesna KOKONDOSKA GRGIČ

**TRANSDIFERENCIACIJA MEZENHIMSKIH
MATIČNIH CELIC PSA V ŽIVČNE CELICE**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJ

Vesna KOKONDOSKA GRGIČ

**TRANSDIFERENCIACIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC
PSA V ŽIVČNE CELICE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**TRANSDIFFERENTIATION OF CANINE MESENCHYMAL STEM
CELLS INTO NEVRONS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Everything you can imagine is real.

- Pablo Picasso-

If you can dream it, you can do it.

- Walt Disney -

Јас го разбираам светот единствено како поле за културен натпревар меѓу народите.

-Гоце Делчев-

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija Študija biotehnologije je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Gregorja Majdiča, za somentorico asis. dr. Katerino Čeh in za recenzenta doc. dr. Miomirja Kneževića.

Komisija za oceno in predstavitev:

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

Član: prof. dr. Gregor Majdič
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Center za genomiko živali

Član: asis. dr. Katerina Čeh
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Center za genomiko živali

Član: doc. dr. Miomir KNEŽEVIC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predstavitve: 29.09.2016

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo 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.

Vesna KOKONDOSKA GRGIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 602.9:591.81(043.2)
KG	mezenhimske matične celice/ transdiferenciacija/ maščobno tkivo/ retinojska kislina/ živčne celice
AV	KOKONDOSKA GRGIČ, Vesna, dipl. bioteh. (UN)
SA	MAJDIČ, Gregor (mentor) / ČEH, Katerina (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2016
IN	TRANSDIFERENCIACIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC PSA V ŽIVČNE CELICE
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	XVII, 93, [8] str., 14 pregl., 32 sl., 7 pril., 172 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Sposobnost transdiferenciacije mezenhimskih matičnih celic, osamljenih iz maščobnega tkiva, obeta velik napredok na področju regenerativne medicine pri nadomeščanju poškodovanega tkiva, kot tudi v farmacevtski industriji pri testiranju novih zdravil. Da lahko en celični tip sprememimo v drug celični tip, je potrebno povzročiti ciljne spremembe znotraj delitvenega cikla celic. Transdiferenciacija mezenhimskih matičnih celic s pomočjo rastnih dejavnikov povzroča trajne spremembe znotraj spremenjenega tipa celic. Iz maščobnega tkiva psov obeh spolov smo osamili MMC, ki smo jih nato s pomočjo retinojske kisline uspešno transdiferencirali v celice živčnega sistema (živčne celice in oporne celice). Ugotovili smo, da celična gostota nasajenih MMC vpliva na uspešnost transdiferenciacije. To nakazuje, da je celična komunikacija nujno potrebna, ko želimo ustvariti trajne spremembe v celici. Do sedaj podobnih raziskav s pasjimi MMC še ni bilo narejenih, zato smo transdiferencirane celice ustrezno karakterizirali s pomočjo imunobarvanja in s pretočno citometrijo. Ugotovili smo, da se celični označevalec GFAP v celični kulturi izraža po 3 dneh transdiferenciacije, po 9 dneh pa se je signal za GFAP znižal za skoraj 50 %. Dokazali smo tudi transdiferenciacijo MMC v odraslih živčnih celicah psa s pomočjo celičnih označevalcev NF-H in MAP2, ki smo jih izmerili na pretočnem citometru, in ugotovili, da se delež pozitivnih celic po 3 in 9 dneh transdiferenciacije giblje med 15 % in 30 % tako pri moškem kot pri ženskem spolu. Razlike v uspešnosti transdiferenciacije med spoloma, iz katerih smo osamili MMC, nismo opazili. Raziskava bi lahko predstavljala napredok pri pripravi nadomestnih celičnih terapij na mestu poškodb živčnega sistema, kot tudi vključitev testiranja zdravil v povezavi z nevrodegenerativnimi boleznimi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 602.9:591.81(043.2)
CX mesenchymal stem cells/ transdiferentiation/ adipose tissue/ retinoic acid/ nevrons/
AU KOKONDOSKA GRGIČ, Vesna
AA MAJDIČ, GREGOR (supervisor)/ ČEH, Katerina (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2016
TI TRANSDIFFERENTIATION OF CANINE MESENCHYMAL STEM CELLS
INTO NEVRONS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes - Biotechnology)
NO XVII, 93, [8] p., 14 tab., 32 fig., 7 ann., 172 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Transdiferentiation ability of adipose derived mesenchymal stem cells promises significant progress in the field of regenerative medicine especially into replacing damaged tissue, as well as in the pharmaceutical industry for testing new drugs. Transdiferentiation plays crucial role during reprogramming of cells that is associated with re-entry into the cell cycle. Those changes could be induced by adding chemicals and growth factors into the medium. After three and nine days treatment of adipose derived MSC with growth factors and retinoic acid, we confirmed transdiferentiation potential of MSC isolated from dogs, into neuronal cell linages (neurons and glia cells). Half of the isolated MSC samples were from female dog adipose tissue and half from male adipose tissue. In this study, we discovered that MSC seed density affects the efficiency of transdiferentiation, which suggests that the cell communication is essential for changing MSC into neurological phenotypes. Until now there were no similar studies about transdiferentiation of dog adipose derived MSC. We properly characterized all significant neural morphological changes by immunocytochemistry and flow cytometry. We detected high expression of GFAP glia cell marker after three days induction with NIMa medium. On the other side the same marker decreased by almost 50 % after nine days. In parallel, we detected positive expression of adult neural markers NF-H and MAP2 between 15 % and 30 % on flow cytometry after three and nine days MSC transdiferentiation, for both sex. During characterization of transdiferentiated neuronal cells, we didn't find sex differences between isolated dog MSC transdiferentiated into neurons. The study could represent progress into cellular regenerative therapy of nerve damage and also could be applicable for neurodegenerative diseases modeling.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	XI
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
SLOVARČEK	XVI
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MATIČNE CELICE	3
2.1.1 Zgodovinski pregled različnih tipov matičnih celic	4
2.2 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE	6
2.3 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE IZ MAŠČOBNEGA TKIVA	9
2.4 OSAMITEV MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IZ MAŠČOBNEGA TKIVA PSA	10
2.5 TRANSDIFERENCIACIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC	11
2.5.1 Transdiferenciacija mezenhimskih matičnih celic psa	12
2.6 NEVROTRANSDIFERENCIACIJA	14
2.6.1 Retinojska kislina, vpletena v procesu nevrotransdiferenciacije MMC v živčne celice	18
2.7 UPORABA MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IZ MAŠČOBNEGA TKIVA V BIOMEDICINI	20
3 MATERIALI IN METODE	23
3.1 KEMIKALIJE, GOJIŠČA, RAZTOPINE, REAGENTI, PROTITELESA, CELIČNI MATERIAL IN LABORATORIJSKA OPREMA	23
3.1.1 Materiali	23
3.1.2 Kemikalije	23
3.1.3 Laboratorijska oprema	24
3.1.4 Gojišča in raztopine	25
3.1.5 Protitelesa	27

3.1.5.1	Uporabljena protitelesa za pretočno citometrijo	27
3.1.5.2	Uporabljena protitelesa za imunobarvanje	27
3.1.5.3	Uporabljena protitelesa za imunobarvanje med optimizacijo transdiferencijskega protokola	28
3.1.6	Celični material	28
3.2	METODE	29
3.2.1	Pridobivanje vzorcev	30
3.2.2	Osamitev primarne kulture mezenhimskih matičnih celic	30
3.2.3	Postopek osamitve MMC iz maščobnega tkiva psa	30
3.2.4	Tripsinizacija	32
3.2.5	Določanje števila celic s števno komoro	33
3.2.5.1	Hemocitometer	33
3.2.5.2	Princip neposrednega določanja števila celic z Bürker Turkovo števno komoro	34
3.2.6	Shranjevanje osamelih MMC	36
3.2.7	Postopek odtajevanja shranjene celice	36
3.2.8	Presajanje in dohranjevanje celične kulture	37
3.2.9	Transdiferenciacija MMC v živčne celice	38
3.2.10	Določanje živosti in morfologije transdiferenciranih MMC celic	39
3.2.11	Imunobarvanje	39
3.2.11.1	Imunohistokemija možganskih rezin	39
3.2.11.1.1	Priprava možganskih rezin	40
3.2.11.1.2	Prvi dan imunohistokemije	41
3.2.11.1.3	Drugi dan imunohistokemije	42
3.2.11.2	Karakterizacija transdiferenciranih MMC z metodo imunocitokemije	43
3.2.11.2.1	Laminin prevleka za krovna stekelca	44
3.2.11.2.2	Prvi dan imunocitokemije	45
3.2.11.2.3	Drugi dan imunocitokemije	45
3.2.12	Pretočna citometrija	46
3.2.13	Potek analize s pretočno citometrijo	48
3.2.13.1	Vezava monoklonskega protitelesa GFAP na barvilo AlexaFlour 488	48
3.2.13.2	Titracijska krivulja protitelesa GFAP	49
3.2.13.3	Karakterizacija transdiferenciranih MMC s pretočno citometrijo	50
3.2.14	Svetlobna mikroskopija	53

3.2.15	Fluorescenčna in konfokalna mikroskopija	53
4	REZULTATI	54
4.1	MORFOLOGIJA	54
4.2	VIABILNOST IN RASTNE KRIVULJE MMC V CELIČNI KULTURI MED SPREMLJANJEM TRANSDIFERENCIACIJE V TREH ČASOVNIH TOČKAH	60
4.3	IMUNOBARVANJE	63
4.3.1	Imunobarvanje pasjih možganskih rezin	63
4.3.2	Karakterizacija pasjih MMC iz maščobnega tkiva z imunobarvanjem po 3 in 9 dneh transdiferenciacije v NIMa gojišču	66
4.4	PRETOČNA CITOMETRIJA	69
4.4.1	Titracijska krivulja vezave monoklonskega protitelesa GFAP - Alexa Fluor 488 na transdiferenciranih celicah	69
4.4.2	Karakterizacija pasjih MMC iz maščobnega tkiva s pretočno citometrijo po 3 in 9 dneh transdiferenciacije v NIMa gojišču	69
5	RAZPRAVA	74
5.1	KARAKTERIZACIJA TRANSDIFERENCIRANIH PASJIH MMC	77
6	SKLEPI	80
7	POVZETEK	81
8	VIRI	82
	ZAHVALA	
	PRILOGA	

KAZALO SLIK

Slika 1: Mezenhimske matične celice, osamljene iz maščobnega tkiva, imajo sposobnost razviti se v vsa tkiva zarodne plasti (ektoderm, mezoderm in endoderm) ter imajo široko terapevtsko uporabnost (prirejeno po Chase in sod. (2011)).....	7
Slika 2: Poti trasdiferenciacije celic (prirejeno po Sisakhtnezhad and Matin, (2012)).	12
Slika 3: Prikaz metabolnih poti, proteinov in genov, ki so vključeni pri transdiferenciaciji MMC v živčne celice (prirejeno po Al Tanoury in sod. (2014)).....	19
Slika 4: Mezenhimske matične celice po transplantaciji na mestu poškodovanih ishemičnih možganov omogočajo živčno regeneracijo. A) MMC izločajo rastne in diferenciacijske dejavnike, ki stimulirajo živčne matične celice (NSCs; angl. neural stem cells) kot živčne predniške celice, ki spodbujajo regeneracijo. Poleg tega MMC stimulirajo tudi mikroglijo celic, ki regulirajo vnetni odgovor možganov, saj pripomore k uspešnejši živčni regeneraciji (prirejeno po van Velthoven in sod., (2012)).	22
Slika 5: Shematski prikaz magistrskega dela od izolacije primarne kulture do transdiferenciacije. Prikazane so tudi časovne točke, pri katerih smo karakterizirali novo nastale celice živčnega sistema.....	29
Slika 6: Postopek osamitve mezenhimskih matičnih celic iz maščobnega tkiva psa (prirejeno po Guidotti in sod., (2013)).	31
Slika 7: Najbolj uporabljeni števna komora, dizajnirana s strani Karla Bürkerja, v kombinaciji z gravirano Neubaurjevo mrežo za štetje celic. Prirejeno po Bastidas in sod. (2014).	34
Slika 8: Primer pravilnega štetja celic znotraj gravirane mreže. Prirejeno po Bastidas in sod. (2014).	35
Slika 9: Izbor ustreznega diferenciacijskega medija za eno žival, med izvajanjem poskusa na Univerzi v Oslu (lastna fotografija).....	38
Slika 10: Priprava blokov, v katerih smo shranili košček možganskega tkiva psa. Povzeto po MHPL Cryostat sectioning Techniques (S. R. Shi in sod., 2008). Oznake črk od A do D so obrazložene v zgornjem tekstu nad/pod sliko.	40
Slika 11: Sestavljeni deli kriostata iz Univerze v Oslu, s katerim smo pripravili rezine in jih nato testirali z metodo imunohistokemije (lastna fotografija).....	41
Slika 12: Priprava površine krovnih stekelc v posodico z 24 luknjicami.....	44
Slika 13: Način lomljenja izvorne svetlobe glede na količino sprejete oz. sipane svetlobe na SSC ali FSC fotodetektorju	46
Slika 14: Sestavljeni deli pretočnega citometra (prirejeno po flow cytometry tutorials, Invitrogen, 23.8.2016, http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html).	47
Slika 15: Sestavljeni deli kromatografskega načina vezave protiteles z barvilom Alexa Flour (lastne fotografije).	48

Slika 16: Osamljene mezenhimske matične celice iz maščobnega tkiva psa v rastnem gojišču Animacel. Merilna skala posnetih fotografij je 1 mm..... 54

Slika 17: **Morfološke spremembe pasjih MMC po tretiranju z diferenciacijskem gojiščem KEM.** Merilna skala posnetih fotografij je 1 mm. **A:** nediferencirane MMC celice takoj po nasaditvi v gojitvenih posodicah, tretiranih z rastnim gojiščem Animacel; **B:** 24 ur tretirane MMC s pre-diferenciacijskimi medijem STIM2; **C:** prvi dan tretiranja z diferenciacijskim medijem KEM; **D:** tretji dan tretiranja z diferenciacijskim medijem KEM.55

Slika 18: **Morfološke spremembe pasjih MMC po tretiranju s pre-diferenciacijskem gojiščem STIM 1** **A:** po 24 urah tretiranja, slikano pri 10x povečavi; **B:** po 24 urah tretiranja, slikano pri 20x povečavi; **C:** po 48 urah tretiranja, slikano pri 10x povečavi; **D:** po 48 urah tretiranja, slikano pri 20x povečavi. Pri tem smo opazili prve oblike nevrosfernih oblik z močno bleščečimi jedri; **F:** Podrobnejši prikaz nevrosfernih oblik. 56

Slika 19: **Morfološke spremembe pasjih MMC po 48 urah tretiranja s pre-diferenciacijskim gojiščem STIM 1 in diferenciacijskem gojiščem NIMA;** **A:** transdiferencirani MMC po 3 dnevnom tretiranju z NIMA, 10x povečava; **B:** transdiferencirani MMC po 3 dnevnom tretiranju z NIMA, 40x povečava; **C:** transdiferencirani MMC po 6 dnevnom tretiranju z NIMA, 10x povečava; **D:** transdiferencirani MMC po 6 dnevnom tretiranju z NIMA, 20x povečava; **E:** transdiferencirane MMC po 9 dnevnom tretiranju z NIMA, 10x povečava; **F:** transdiferencirane MMC po 9 dnevnom tretiranju z NIMA, 20x povečava;..... 58

Slika 20: **Morfološke spremembe pri različnih točkah transdiferenciacije pasjih MMC.** Primerjali smo moške in ženske pasje MMC, ki smo jih 48 ur tretirali s pre-diferenciacijskim gojiščem STIM 1 in diferenciacijskim NIMA; **A:** Ženske MMC po 48 urah tretiranja s STIM, 10x povečava; **B:** Moške MMC po 48 urah tretiranja s STIM, 10x povečava; **C:** Ženske MMC po 3 dneh tretiranja z NIMA, 10x povečava; **D:** Moške MMC po 3 dneh tretiranja z NIMA, 10x povečava; **E:** Ženske MMC po 9 dneh tretiranja z NIMA, 10x povečava; **F:** Moške MMC po 9 dneh tretiranja z NIMA, 10x povečava; **rumene puščice** ponazarjajo prve nevrosferne oblike; **rdeče puščice** ponazarjajo morfološke spremembe pri ženskih MMC, ki spominjajo na živčne celice (veliko svetlo jedro in dolgi podaljški, ki spominjajo na dendrite); **modre puščice** ponazarjajo morfološke spremembe pri moških MMC, ki spominjajo na živčne celice. 59

Slika 21: Rastne krivulje za vse živali, vključene v poskusu transdiferenciacije MMC v živčne celice. Na x osi točka 1 pomeni nasaditev začetnega števila celic za poskus; točka 2 pomeni število celic, ko smo začeli s tretiranjem MMC najprej z STIM 1 gojiščem ter nato po 48 urah zamenjali NIMA gojišče; točka 3 pomeni število celic po 3 dneh transdiferenciacije; točka 4 pomeni število celic po 9 dneh transdiferenciacije. 61

Slika 22: Rastne krivulje tretiranih MMC glede na spol, iz katerega so osamljene. Rastna krivulja je izrisana od začetne koncentracije do preračunane koncentracije pri 9 dnevu transdiferenciacije. Na x osi prva točka 1 pomeni nasaditev začetnega števila celic za poskus; točka 2 pomeni število celic, ko smo začeli s tretiranjem MMC najprej s STIM 1 gojišče ter nato po 48 urah zamenjali NIMA gojišče; točka 3 pomeni število celic po 3 dneh transdiferenciacije; točka 4 pomeni število celic po 9 dneh transdiferenciacije. 62

Slika 23: Prikaz viabilnosti MMC med transdiferenciacijo združenih glede na spol, iz katerega smo MMC osamili. 62

Slika 24: Pasje možganske rezine sive mase, označene s protitelesi proti specifičnim živčnim celicam. Podatki o protitelesih so zabeleženi v preglednici 9. A: zeleno označen GFAP; B: rdeče označen NF-pan; C: modro označena celična jedra s Hoechst barvilom; D: negativni signal za Nestin, celični obrisi se vidijo v svetlo sivi barvi; E: Združene vse slike od A do D.	64
Slika 25: Pasje možganske rezine sive mase označene s protitelesi proti specifičnim živčnim celicam. Podatki o protitelesih so zabeleženi v preglednici 9. A: zeleno označen MAP2; B: rdeče označen β III tubilin; C: modro označena celična jedra s Hoechst barvilom; D: združene slike od A do C.	65
Slika 26: Tri dnevno tretirane MMC, ženskega spola z NIMa gojiščem v predhodnem poskusu. A: zeleno označen β III tubulin in negativni signal za NF-pan; B: negativna sekundarna kontrola – Cy2; C: rdeče označena β III tubulin in rdeče označena Pax6; D: negativna sekundarna kontrola – Cy3; E: zeleno označen GFAP; F: negativna sek. kontrola– Alexa 488. Modro označena so celična jedra s Hoechst barvilom.	67
Slika 27: Devet dni tretirane MMC, ženskega spola z NIMa gojiščem v predhodnem poskusu. A: zeleno označen NF-H; B: negativna sekundarna kontrola– Cy2; C: negativni signal nestina; D: negativna sekundarna kontrola– Alexa 647; E: zeleno označen MAP2; F: negativna sekundarna kontrola – Cy2. Modro označena so celična jedra s Hoechst barvilom.	68
Slika 28: Titracijska krivulja protitelesa GFAP, ki je bil vezan z barvilm Alexa Fluor 488.	69
Slika 29: Primer točkovnih diagramov pri karakterizaciji MMC s pretočno citometrijo za celični označevalec GFAP glede na velikosti in zrnatosti. A: nediferencirane MMC celice, ki ne izražajo GFAP B: tri dni transdiferencirane celice, ki so pozitivne za celični označevalec GFAP. Kratice FSC in SSC so obrazložene v poglavju 3.2.12.	70
Slika 30: Primer histogramov za karakterizacijo transdiferenciranih MMC z celičnimi označevalci GFAP, NF-F in MAP2. A: Histogram izražanja GFAP, rdeča - nedif. MMC in neoznačene MMC, oranžna - GFAP+ MMC po 3 dneh transdif., modra - nedif. MMC sek. kontrola po 9 dneh transdif., zelena - GFAP+ MMC po 9 dneh transdif.; B: Histogramnegativne kontrole za NF-H, modra - nedif. in neoznačene MMC, rdeča - nedif. MMC sek. kontrola po 3 dneh transdif.; C: Histogram izražanja NF-H, rdeča - nedif.MMC sek.kontrola po 9 dneh transdif., oranžna - NF-H+ MMC po 9 dneh transdif., modra - NF-H+ MMC po 3 dneh transdif.; D: Histogramnegativne kontrole za MAP2, modra - nedif. in neoznačene MMC, rdeča - nedif. MMC sek.kontrola po 3 dneh transdif. E: Histogram izražanja MAP2, rdeča - nedif. MMC sek. kontrola po 9 dneh transdif., oranžna - NF-H+ MMC po 9 dneh transdif., modra - NF-H+ MMC po 3 dneh transdif.	71
Slika 31: Delež pozitivnih celic (%) za GFAP, MAP2 in NF-H v treh časovnih točkah za vseh šest živali. Oznaka M pomeni moški spol, Ž pomeni ženski spol.	72
Slika 32: Delež pozitivnih celic (%) za GFAP, MAP2 in NF-H v treh časovnih točkah za moški in ženski spol.	73

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Matične celice in njihov potentni potencial.....	4
Preglednica 2: Pregled obstoječih podatkov za karakterizacijo MMC iz pasjih tkiv po literaturi. Oznaka – pomeni, da ni podatkov v literaturi (Bakker in sod., 2014).....	13
Preglednica 3: Pregled postopkov transdiferenciacije MMC v živčne celice in uporabljeni diferenciacijski gojišča od leta 2000 do 2016.....	16
Preglednica 4: Pregled vodilnih podjetji v veterinarski medicini, ki ponujajo zdravljenje bolezni z matičnimi celicami iz maščobnega tkiva domačih živali (prirejeno po Max in sod., (2015)).....	20
Preglednica 5: Pred-diferenciacijska gojišča za pripravo na transdiferenciacijo MMC celic.	25
Preglednica 6: Diferenciacijska gojišča za transdiferenciacijo MMC celic.	26
Preglednica 7: Število živali, iz katerih so bili osamljene MMC za poskus (M - moški spol; Ž – ženski spol). Podatki z oznako / niso znani.....	30
Preglednica 8: Uporabljeni volumni tripsina in medija glede na velikosti gojitvene posodice.	32
Preglednica 9: Uporabljeni protitelesa in ustrezne redčitve za imunohistokemijo.....	42
Preglednica 10: Uporabljeni protitelesa za določanje uspešnosti transdiferenciacije	43
Preglednica 11: Prikaz dizajniranega poskusa za karakterizacijo transdiferenciranih celic pri eni točki s pomočjo pretočnega citometra.....	51
Preglednica 12: Preračunano število celic/ml (koncentracija) v različnih časovnih točkah za vsako žival posebej ter geometrijsko sredino ob združitvi treh živali glede na spol.....	60
Preglednica 13: Statistična analiza podatkov števja celic/ml tretirani v gojišču NIMA v treh časovnih točkah.	61
Preglednica 14: Primer izločanja tehničnih osamelcev s pomočjo Thompson Tau koeficiente za tri tehnične meritve nediferenciranih MMC, GFAP (-) celic.....	72

KAZALO PRILOG

Priloga A: Morfološke spremembe pasjih MMC po 48 urnem tretiranju v prediferenciacijskem gojišču STIM 1 in diferenciacijskem gojišču NIMb.

Priloga B: Morfološke spremembe pasjih MMC po 48 urnem tretiranju v prediferenciacijskem gojišču STIM 1 in diferenciacijskem gojišču NIMc.

Priloga C: Transdiferenciacija pasjih MMC, osamljenih iz maščobnega tkiva (moški spol).

Priloga D: Transdiferenciacija pasjih MMC, osamljenih iz maščobnega tkiva (ženski spol).

Priloga E: Tabelarni prikaz podatkov, pridobljenih z merjenjem deleža pozitivnih celic za GFAP, MAP2 in NF-H označevalcev pri vseh živalih, vključenih v magistrskem delu.

Priloga F: Tabelarni prikaz povprečnih deležev pozitivnih celic za GFAP, MAP2 in NF-H označevalcev glede na spol.

Priloga G: Tabelarni prikaz statistično obdelanih rezultatov viabilnosti celic med transdiferenciacijo v treh časovnih točkah.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADSC	matične celice iz maščobnega tkiva (angl. <i>adipose derived stem cells</i>)
AK	amino-kislina (angl. <i>amino acid</i>)
ASC	odrasle matične celice (angl. <i>adult stem cells</i>)
BDNF	nevrotrofični dejavnik, pridobljen iz možganov (angl. <i>brain derived neurotrophic factor</i>)
bEGF	bazični epitelni rastni dejavnik (angl. <i>basic epidermal growth factor</i>)
bFGF	bazični fibroblastni rastni dejavnik (angl. <i>basic fibroblast growth factor</i>)
BHA	butil-hidroksianizol (angl. <i>butylated hydroxyanisole</i>)
BME	β -merkaptetoanol
BSA	goveji serumski albumin (angl. <i>bovine serum albumin</i>)
cAMP	ciklični adenozin monofosfat
CD	označevalec pripadnosti (angl. <i>cluster of differentiation</i>) npr. CD86, CD45, CD11a, CD14, CD117, CD9, CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90, CD105, CD166, CDH1, CDKN1B
CFU-F	fibroblastne kolonijske enote (angl. <i>fibroblast colony-formating units</i>)
CO₂	ogljikov dioksid
DAPI	4,6-dimidino-2-fenilindol (angl. <i>4,6-diamidino-2-phenylindole</i>)
dbcAMP	2-butiril ciklični adenozin monofosfat (angl. <i>dibutyryl cyclic adenosine monophosphate</i>)
DMEM	dulbeccovo modificirano gojišče (angl. <i>dulbecco's modified egle's medium</i>)
DMSO	dimetil sulfoksid (angl. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPBS	fosfatni pufer (angl. <i>dulbecco's phosphate buffered saline</i>)
EMC	embrionalne matične celice (angl. <i>embrionic stem cells</i>)
FBS	fetalni goveji serum (angl. <i>fetal bovine Serum</i>)
FITC	fluorescein-izocijanat barvilo
GFAP	kislá fibrilarna beljakovina (angl. <i>glial fibrillary acid protein</i>)
hEGF	človeški epitelni rastni dejavnik (angl. <i>human epidermal growth factor</i>)
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
hESC	humane embrionalne matične celice

HLA	humani levkocitni antigen (angl. <i>human leucocyte antigen</i>)
IBMX	3-izobutil 1-metilksantin (angl. <i>isobutylmethylxanthine</i>)
IL6	interleukin 6
INN	indometacin (angl. <i>indomethacin</i>)
iPMC	inducirane pluripotentne matične celice (angl. <i>iPSC - induced pluripotent stem cell</i>)
MAP2	mikrotobularni protein (angl. <i>microtubule-associated protein 2</i>)
MAPC	multipotentne celice prednice odraslega MAPC (angl. <i>multipotent adult progenitor cells</i>)
MC	matična celica (angl. <i>stem cell</i>)
MHC I	histo-kompatibilnega kompleksa I (angl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MHC II	histo-kompatibilnega kompleksa II
MMC	mezenhimske matične celice (angl. <i>mesenchymal stem cells</i>)
mRNA	informacijska RNA (angl. <i>messenger RNA</i>)
N2	nevrotvorni dejavnik
Na-azid	natrijev azid
NF-H	nevralni faktor – H
NIM	oznaka za diferenciacijsko gojišče, uporabljeno v magistrski nalogi
NSE	nevron specefično enolazo
O.C.T.	O.C.T. medij (angl. <i>optimum cutting temperature</i>)
OCT4	prepisovalni dejavnik (angl. <i>octamer-binding transcription factor 4</i>)
PDGF	(angl. <i>platelet-derived growth factor</i>)
RA	retinojska kislina
RNA	ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid</i>)
RT-PCR	reverzna prepisovalna in verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SALL2,	prepisovalni dejavnik (angl. <i>Sal-like protein 2</i>)
sek.kontrola	sekundarna kontrola
siRNA	mala interferenčna RNA (angl. <i>small interfering RNA</i>)
StDev	standardna deviacija

STIM	oznaka za pre-diferenciacijsko gojišče, uporabljeno v magistrski nalogi
SVF	stromalna vaskularna frakcija (angl. <i>stromal vascular fraction</i>)
VSEL	zelo majhne celice, podobne embrionalnim matičnim celicam (angl. <i>very small embryonic-like stem cells</i>)

SLOVARČEK

IZRAZ	ANGLEŠKI IZRAZ	OPIS-KOMENTAR
Celična linija	Cell line	Celična populacija z istimi lastnosti (<i>in vitro</i>), ki jo daljši čas ohranjamo v gojitvenih posodicah.
Celično zdravljenje s celicami	Cell Therapy	Celično zdravljenje s celicami je tretji tip naprednega zdravljenja poleg genske terapije in tkivnega inženirstva. Specializirane celične linije gojene <i>in vitro</i> presadimo ali vbrizgamo na mesto poškodovanega tkiva.
Diferenciacija	Differentiation	Proces, v katerem se manj specializirane celice ali tkiva spreminjajo v bolj specializirane celice ali tkiva med razvojem. Diferenciacija poteka med razvojem odraslega organizma, kjer se odrasle matične celice delijo, diferencirajo in skrbijo za popravljanje poškodb.
Matična celica	Stem cell	Matična celica je nediferencirana celica, ki ima lastnost samoobnavljanja in lastnost različne potentnosti glede na izvor osamljenih celic (embrionalne oz. zarodne celice so pluripotentne, odrasle matične celice pa so multipotentne). MC se samoobnavlja z nesimetrično delitvijo.
Modeliranje bolezni	Disease modeling	Uporaba celičnih kultur ali modelnih živali za raziskave človeških bolezni.
Matične celice iz maščobnega tkiva	Adipose derived stem cell	Odrasle multipluripotentne matične celice, ki jih osamimo iz maščobnega tkiva živali ali človeka.

Regenerativna medicina	Regenerative medicine	Veja medicine, ki se ukvarja z obnovo fizioloških funkcij organov in tkiv in pri tem lahko uporablja tudi <i>in vitro</i> gojene celice, metode tkivnega inženirstva, različne naravne rastne dejavnike in druge biotehnološke metode.
Pretočna Citometrija	Flow Cytometry	Citometrija je metoda za karakterizacijo in merjenje lastnosti celic in celičnih komponent, ki se giblja v toku.
Samoobnavljanje	Self-renewing	Sposobnost dolgotrajnega deljenja in tvorbe sebi identičnih kopij.
Transdiferenciacija	Transdifferentiation	Danes je izraz transdiferenciacija uvrščen v plastičnost matičnih celic, pri katerem se diferencirane celice spremenijo v specializirane celice drugega tkiva, pri tem pa izgubijo fenotip prvega in pridobijo nove fenotipske lastnosti novega tipa.
Transformacija	Transformation	Predstavlja spreminjače nekega stanja, dejanja ali procesa, kot je spremembu v obliki, strukturi in funkciji.
Nevrosfera	Neurospher	Vmesna predniška oblika pri formiraju živčnih celic.

1 UVOD

Mezenhimske matične celice (MMC) so samo-obnavljajoče se, multipotentne, odrasle celice, ki imajo mezodermalno in nevro-ektodermalno poreklo (Ferroni in sod., 2013). Najdemo jih v številnih tkivih (maščobnem tkivu, kostnem mozgu, popkovnični krvi, horionskih gubah placente, amnijski tekočini, krvi, pljučih itd.), ki so enostavno dostopna za odvzem ter predstavljajo potencialno pomemben vir celic za zdravljenje. Sposobnost transdiferenciacije MMC v osteoblaste, hondroblaste in adipocite v pogojih *in vitro* je bila dokazana v številnih raziskavah od odkritja MMC naprej (Gronthos in sod., 2001; Hauner in sod., 1987). Do leta 2000 je veljala teorija, da so mezenhimske matične celice sposobne diferenciacije samo v tkiva mezoderma. Teorijo je pod vprašaj postavila raziskovalna skupina Woodburies. V raziskavi iz leta 2000 so pokazali, da MMC osamljene iz kostnega mozga, ki so bile izpostavljene butil hidroksi anizolu, beta-merkaptoetanolu in dimetilsulfoksidu, izražajo proteine, značilne za oporne celice živčnega sistema, in živčne celice (Woodbury in sod., 2000). Raziskave, ki so sledile, so predstavile različne rezultate in velikokrat nasprotujejoče zaključke, tako da do danes ni povsem dokazana sposobnost diferenciacije MMC v funkcionalne živčne celice. Večina raziskav transdiferenciacije je bila izvedena na humanih celicah in celicah glodavcev (Anghileri in sod., 2008; Zemelko in sod., 2013; Zuk in sod., 2002).

Pasje mezenhimske matične celice (MMC), osamljene iz maščobnega tkiva, se vedno bolj uporabljajo v bazičnih raziskavah transdiferenciacije MMC v živčne celice in/ali oporne celice živčnega sistema (Lim in sod., 2010; Park in sod., 2012).

Ta možnost je zelo pomembna za razvoj nadaljnjih terapij zdravljenja poškodb centralnega živčnega sistema z matičnimi celicami iz maščobe. V tem primeru bi zdravljenje psov s poškodbami centralnega živčnega sistema ali z nevrodegenerativnimi boleznimi lahko pripomoglo tudi k hitrejšemu razvoju takšnih zdravljenj pri ljudeh. Vendar pa malo raziskav poroča o transdiferenciaciji pasjih MMC v celice živčnega sistema (Lim in sod., 2010). Zato so potrebne dodatne raziskave transdiferenciacij maščobnih mezenhimskih matičnih celic v živčne celice, predvsem zaradi kompleksnosti in dolgotrajnosti nevroloških transdiferenciacij, ki vključujejo natančno delovanje različnih rastnih in prepisovalnih dejavnikov in verjetno tudi epigenetske mehanizme (Boulland in sod., 2013).

Poleg celičnih terapij za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni z uporabo postopkov transdiferenciacije MMC se obeta tudi njihova uporaba v predkliničnih in kliničnih študijah testiranja farmacevtskih izdelkov. Ideja je, da bi postavili model določene bolezni v gojitvenih posodah in kontrolirano spremljali delovanja novih zdravil na celični ravni. To bi predstavljalo velik napredok pri razvoju novih zdravil ter revolucionarni korak k personalizirani medicini.

1.1 CILJI NALOGE

Za raziskave ali terapevtsko uporabo je potrebno MMC ustrezzo osamiti. Uporabili smo metodo, ki jo je podjetje Animacel d.o.o že vpeljalo v rutinsko delo osamitve MMC. Po ustreznji osamitvi MMC smo jih ustrezzo shranili. V raziskovalnem delu smo pokazali možnost transdiferenciacije MMC, osamljenih iz maščobnega tkiva psov, v živčne celice. Razvili in optimizirali smo metodo transdiferenciacije pasjih matičnih celic v celice živčnega sistema ter z molekularno biološkimi metodami spremljali proces transdiferenciacije v različnih časovnih točkah.

Do sedaj podobne raziskave s pasjimi MMC še niso bile narejene, kar je bil pomislek glede sposobnosti transdiferenciacije z rastnimi dejavniki. Predhodne raziskave, izvedene na Univerzi v Oslu med študijsko prakso, so pokazale, da imajo MMC, osamljene iz maščobnega tkiva psa, transdiferencijski potencial ter da vsa tri protitelesa, ki smo jih uporabili, prepoznavajo pasje antigene.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Glede na predhodno objavljene rezultate različnih raziskav pri drugih vrstah vključno s človekom in glede na naše predhodne rezultate smo postavili naslednje hipoteze:

- a. Pasje mezenhimske matične celice so se sposobne transdiferencirati v celice živčnega sistema (živčne celice in oporne celice);
- b. Koncentracija retinojske kisline ima vpliv v procesu transdiferenciaciji MMC;
- c. V transdiferenciranih živčnih celicah se izražajo geni za nevralni faktor H (NF-H), tubulin beta III, MAP2 specifični za živčne ceice in gen GFAP, ki je specifičen za oporne celice živčnega sistema (glia celice);
- d. Pri procesu transdiferenciacije moških in ženskih MMC (osamljeni iz maščobnega tkiva psa) v živčne celice pričakujemo, da bomo opazili razliko med spoloma živali, iz katerih smo osamili MMC za transdiferenciacijo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MATIČNE CELICE

Vsakodnevno v času življenja vseh vretenčarjev obstaja majhno število posebnih celic, ki imajo ključno vlogo pri obnavljanju odmrlih celic. Te posebne celice omogočajo obnavljanje tkiv in organov po številnih poškodb in okvar v vsakdanjem življenju. Imenujemo jih matične celice (MC), saj predstavljajo malo številno populacijo, razporejeno v posebnih nišah znotraj vseh delov telesa vretenčarjev. Matična celica je nediferencirana celica zarodka, plodu ali odraslega vretenčarja, po velikosti podobna limfocitom (Rožman in sod., 2007), ki ima sposobnost samoobnavljanja v daljših časovnih okvirjih celične delitve brez večjih sprememb svoje osnovne lastnosti (Wei in sod., 2013). Ostali dve lastnosti MC sta plastičnost in diferenciacija v specializirane celice ali v bolj usmerjene tkivne celice (Rožman in sod., 2007).

Matične celice se samoobnavljajo z nesimetrično delitvijo, pri kateri nastaneta dve neenakomerni hčerinski celici - ena bolj podobna materinski MC ter druga, bolj diferencirana hčerinska celica. Bolj diferencirana celica ima manjši razvojni potencial od svoje sestrške in se imenuje prekurzorska celica, iz katerih nastanejo funkcionalne celice, ki se združujejo v tkiva (Zipori, 2005; Inaba in Yamashita, 2012; Knoblich, 2008). Tak mehanizem samoobnavljanja omogoča ohranjanje populacije matičnih celic med delitvenim procesom (Denham in sod., 2005; Rožman in sod., 2007).

Lastnost plastičnost pomeni, da so se MC sposobne diferencirati tudi v celice drugih tkiv poleg svojega lastnega, iz katerega izhajajo. Izraz plastičnost zajema štiri različne elemente, ki so ključni za razumevanje izraza. Prvi element je dediferenciacija, ki pomeni sposobnost odraslim ali linijsko usmerjenim celicam vrnitev v bolj primitivne oblike. Drugi element transdeterminacija pomeni preskok ene predniške linije v drugo predniško celično linijo. Tretji element transdiferenciacija je proces, pri katerem se tkivne matične celice iz enega tkiva odraslega spremenijo (oz. diferencirajo) v specializirane celice drugega tkiva. Četrти element je fuzija MC z drugimi diferenciranimi celicami v tkivu, pri katerih nastane nova celična vrsta (Martin-Rendon in Watt, 2003; Rožman in sod., 2007).

Danes lahko matične celice osamimo iz različnih tkiv in pri različnih starostih vretenčarjev, vendar se te matične celice med sabo razlikujejo. Prva razvrstitev ne glede na tip tkiva, iz katerih osamimo MC, so odrasle matične celice (ASC) in embrionalne matične celice (EMC). Embrionalne matične celice izvirajo iz celic zarodka na stopnji blastociste. Po izolaciji pridobljenih celic se podvojujejo zelo hitro in teoretično se lahko razvijejo v katero koli celico. Ključni problem uporabe embrionalnih matičnih celic je povezan s številnimi moralno-etičnimi vprašanji (Health, 2009; Rožman in sod., 2007; Yu in Thomson, 2008). Po drugi strani se odrasle matične celice po osamitvi delijo nekoliko počasneje od embrionalnih matičnih celic, vendar pa je dostopnost osamitve embrionalnih matičnih celic mnogokrat omejena. Po rojstvu odraslih matičnih celic najdemo v vseh tkivih vretenčarjev, vendar največ v kostnem mozgu in maščobi. Glede na sposobnost za razvijanje v različne

tipe celic (potentnost) ločimo totipotentne, pluripotentne, multipotentne in unipotentne matične celice (**Preglednica 1**) (Atala in sod., 2011).

Preglednica 1: Matične celice in njihov potentni potencial

Tip matičnih celic	Definicija-opis lastnosti	Lokacija v tkivu
TOTIPOTENTNA	Tip celice, iz katere se lahko tvori celoten organizem, vključno s trofoblastom (ekstra embrionalno tkivo).	Embrio in zgoden blastomer
PLURIPOTENTNA	Tip celice, ki ima sposobnost tvoriti vse telesne celice vretenčarjev, vključno s spolnimi celicami.	Embrionalne matične celice, iPS celice
MULTIPOTENTNA	Tip celice, ki ima manjši potentni in diferencijski potencial kot pluripotentne in totipotentne tipe celic.	Tkivno specifični hematopoetske, MMC)
UNIPOTENTNA	Tip celice, ki je tkivno specifična s sposobnostjo samoobnavljanja	Predniške celice v organih (npr. koža, mišice)

2.1.1 Zgodovinski pregled različnih tipov matičnih celic

Izraz "matična celica" (angl. Stem cell) je prvič omenil nemški znanstvenik Ernst Haeckel leta 1868 v svoji raziskavi in opisal, da so enocelični organizmi evolucijski predniki večceličnih organizmov. Dve leti kasneje je Haeckel uporabil isti izraz za pojasnitev oploditve jajčec. Izraz je dobil bistvo leta 1892, ko sta Valentin Hacker in Theodor Boveri pojasnila, da "nem. *Stammezelle*" opisuje celice zgodnega embrija, ki predstavljajo vir prvobitnih izvornih celic (Morange, 2006). Konec devetnajstega stoletja so se pojavile prve teoretične predpostavke (postulati) o sposobnostih samoobnavljanja določenih tkiv. Leta 1907 je ameriški znanstvenik Ross Granville Harrison objavil prvi znanstveni članek o gojenju koščka tkiva – živčnih vlaken žab v laboratoriju in postal zelo vpliven na področju celičnih kultur *in vitro* v tem času (Maienschein, 2010).

Poseben pomen v razvoju znanosti na področju matičnih celic so dodale raziskave krvnih celic ruskih znanstvenikov. Wera Dantschakoff in Alexander Maximow sta pojasnila, da limfociti predstavljajo "matične celice" za tvorbo krvnih celic. Teorijo sta podprla tudi nemška znanstvenika Ernst Neumann in Konigsbergs s svojim odkritjem, da krvne celice nastajajo v kostnem mozgu vretenčarjev (Neumann, 1868). Alexander Maximilov je uradno priznan kot "oče" koncepta o hematopoetskih matičnih celicah, ki ga je postavil leta 1909.

Prvo uspešno alogensko presaditev kostnega mozga s tkivi drugega organizma je leta 1968 opravil dr. Robert A. Good s svojimi sodelavci. Istega leta so znanstveniki prvič *in vitro* oplodili človeško jajče, kar je odprlo možnost odkrivanja totipotentnosti embrionalnih matičnih celic. Znanstvena odkritja na področju teratomov (Cohnheim, 1877) in raka so pripeljala do ključnega odkritja embrionalnih matičnih celic (Brinster, 1974; Papaioannou

in sod., 1975; Mintz in sod., 1975). Novo poglavje v medicini je zapisal Robert Edward leta 1981 s postavljivo prve *in vitro* oploditve pri človeku (raziskava znana kot "test-tube baby"), ki ga je isto leto popeljala do odkritja embrionalnih matičnih celic (Edwards, 2001). Leta 1981 so znanstveniki iz dveh različnih skupin, prva pod vodstvom Gaila Martina (Univerza v Californiji, Sanfrancisco) in druga pod vodstvom Martina Evansa in Matthewa Kaufmana, prvič osamili embrionalne matične celice iz mišjih zarodkov. Znanstvenik James Thompson z Univerze Wisconsin – Madison je leta 1998 prvič osamil človeške embrionalne matične celice. Osamitev embrionalnih matičnih celic iz človeških zarodkov je sprožila številna etična vprašanja, zaradi česar so se za več let upočasnile raziskave na tem področju v ZDA po odloku predsednika Busha leta 2001. Revolucionarno odkritje na področju matičnih celice je leta 2006 postavil Japonec Shinya Yamanakaki pri odkritju novega tipa pluripotentnih celic neposredno iz odraslih somatskih celic. Poimenoval jih je inducibilne pluripotentne matične celice (*iPS*), in glede na njihove prednosti dodal, da lahko zamenjajo embrionalne matične celice. Yamanaka je za svoje odkritje prijel Nobelovo nagrado za področje fiziologije in medicine za leto 2012. Vierbuchen in sod. (2010) so v reviji Nature objavili uspešno transdiferenciacijo (*in vitro*) mišjih fibroblastov v funkcionalne nevrone s pomočjo treh prepisovalnih dejavnikov (*Ascl1*, *Brn2*, and *Myt1l*). Od odkritja *iPS* celic do danes so se raziskave na področju matičnih celic usmerile k transdiferenciaciji somatskih celic s pomočjo prepisovalnih dejavnikov (Ieda in sod., 2010; Swistowski in sod., 2010; Szabo in sod., 2010) ali pa s kemijskimi komponentami, ki ciljno vplivajo na delitveni celični cikel. Transdiferenciacija predstavlja nekakšno bližnjico do želenega celičnega tipa, saj reprogramiranje poteka brez vmesne diferenciacije v pluripotentno celico. Bistveni napredek je dosežen z modeliranjem človeških bolezni s pomočjo različnih tipov matičnih celic (Colman in Dreesen, 2009; Glavaski-Joksimovic in Bohn, 2013; Soldner in Jaenisch, 2012; H. Song in sod., 2010) in možnosti testiranja novih zdravil neposredno na človeških celicah v gojitvenih posodicah.

Uporaba odraslih matičnih celic iz maščobnega tkiva se je najbolje izkazala na področju celičnih terapij in v regenerativni medicini za zdravljenje poškodb vezivnega, hrustančnega ali kostnega tkiva (Minteer in sod., 2015). V vzponu so tudi raziskave, ki iščejo primerne bio-razgradljive materiale, kjer bi ustrezno gojili matične celice. Tako pripravljen 3D material s celicami lahko pripomore k hitrejšemu nadomestilu manjkajočega tkiva ali celjenja ran pri živalih in človeku (Adams in sod., 2012; Correlo in sod., 2011; Hutmacher, 2000; Park in sod., 2012; Wei in sod., 2013). V regenerativni medicini se vpeljuje tudi 3D tiskalnik, ki omogoča natančen izris določenih tkiv. Predvidevajo, da se bo s pomočjo matičnih celic v bližnji prihodnosti začelo tiskati tudi bolj kompleksne organe. (Murphy in Atala, 2014).

Če pogledamo skozi zgodovino, lahko sklepamo, da je odkritje matičnih celic doseglo svoje bistvo pri zamenjavi poškodovanih celic z novimi, ki imajo identično funkcijo. Prihodnost, ki jo vidimo, stremi k personalizirani medicini vsakega posameznika do te mere, da bodo

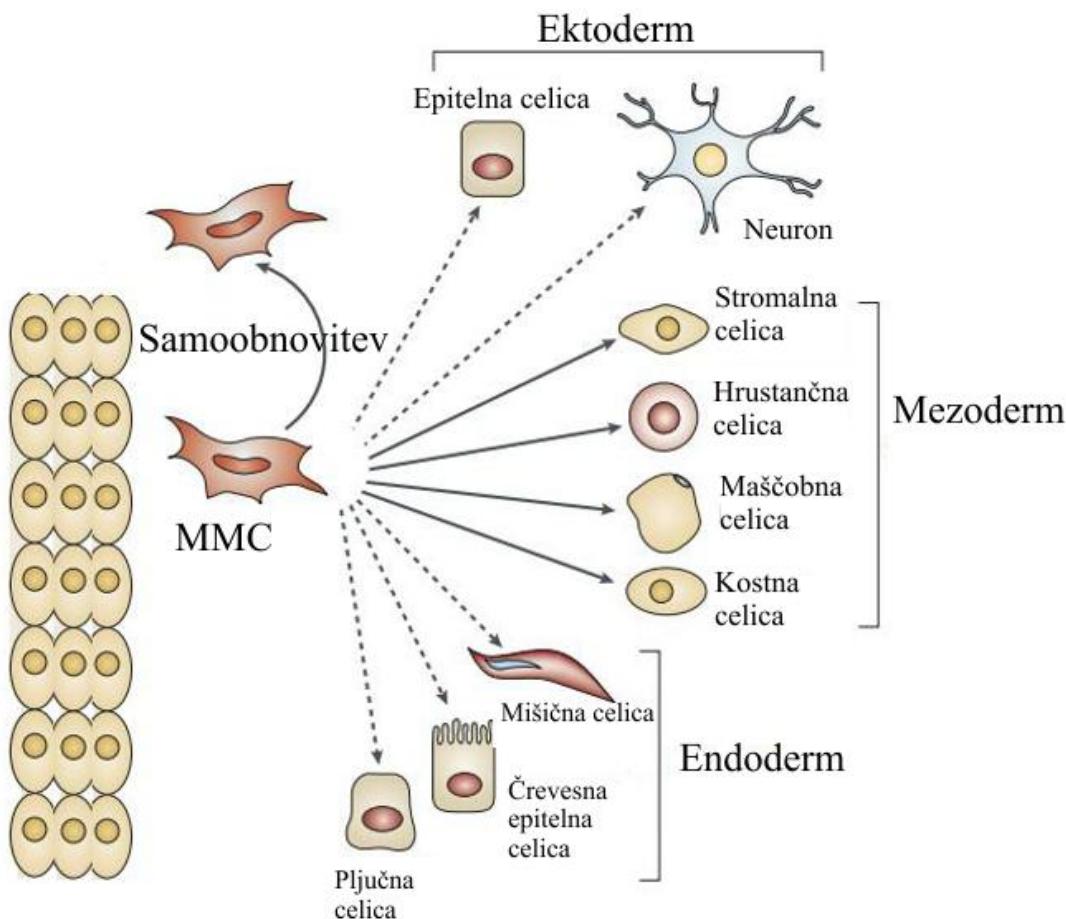
lahko zelo hitro in učinkovito zamenjali organe ali pa ciljno zdravili bolezen s pomočjo zdravil, testiranih na tkivnih kulturah za vsakega posameznika posebej.

2.2 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE

Mezenhimske matične celice uvrščamo v skupino odraslih matičnih celic, ki so multipotentne, se samoobnavljajo v specializiran tip celic znotraj tkiva, iz katerega izhajajo in diferencirajo v različne tipe mezodermalnih in nevro-ektodermalnih tkiv (Ferroni in sod., 2013; Zeidán-Chuliá in Noda, 2009). Zato jih nekateri imenujejo postnatalne matične celice (Ferroni in sod., 2013). Friedenstein in sod. (1966) so prvič opazili osteogeni potencial po transplantaciji celic kostnega mozga pri živalih. Poimenovali so jih osteogene matične celice, ki predstavljajo neko majhno sub-populacijo znotraj celic kostnega mozga. Ista raziskovalna skupina je leta 1974 osamila MMC iz kostnega mozga in jih poimenovala stromalni predniki kostnega mozga (angl. *bone marrow stromal progenitors*), ki imajo sposobnost tvoriti fibroblastne kolonije in rastejo po površini plastike kot enoslojne celične kulture (Friedenstein, in sod., 1974). Izraz mezenhimske matične celice se prvič omenja v raziskavi o kostnih in hrustančnih tvorbah, osamljenih iz odraslih tkiv in ponovno avtologno transplantiranih v poškodovano tkivo (Caplan, 1991). V literaturi lahko zasledimo uporabo različnih izrazov MMC, znanih kot angl. *marrow stromal cells* (Prockop, 1997) ali *mesenchymal stromal cells* (Keating 2006) ali angl. *mesenchymal progenitor cells* (Johnstone in sod., 1998), za katere so se odprla številna vprašanja o uporabi pravilnega izraza (Dominici in sod., 2006a; Horwitz in sod., 2005). Najbolj pogosto uporabljan izraz v literaturi je angl. *mesenchymal stem cells*, čeprav nekateri znanstveniki menijo, da ni primeren za opis teh matičnih celic (Bianco in sod., 2008).

Omejitev uporabe embrionalnih matičnih celic v kliniki je pripomogla, da se je povečalo zanimanje za mezenhimske matične celice. Glavni razlog je, da niso etično sporne, enostavno in kontrolirano jih lahko osamimo ter ne prihaja do nastanka teratomov po presaditvi v živ organizem (Xin Wei in sod., 2013). Po prvi izolaciji MMC iz kostnega mozga so jih kasneje osamili še iz mišičnega tkiva (Nathanson, 1985), vezivnega tkiva (Nakahara in sod., 1991), maščobnega tkiva (Zuk in sod., 2001; Zuk in sod., 2002), sinovialne membrane (Bari in sod., 2001), mlečnih zob (Miura in sod., 2003), kože (Belicchi in sod., 2004), trabekularnih kosti (Song in sod., 2005), placente (Soncini in sod., 2007), periferne krvi (M. Shi in sod., 2009) in skeletnih mišic (Dodson in sod., 2010).

Število osamljenih MMC ter invazivnost odvzema tkiva iz telesa vretenčarjev predstavlja največjo omejitev, čeprav obstaja veliko možnosti izbire tkiva, iz katerega lahko osamimo MMC (Caplan, 1991; Pittenger in sod., 1999). V tej smeri se je izkazalo, da ima maščobno tkivo največ prednosti v primerjavi z drugimi tkivi (Casteilla in sod., 2005; Oedayrajsingh-Varma in sod., 2006). Zelo pomemben podatek so objavili D’Ippolito in sodelavci o pogostnosti in sposobnosti diferenciacije MMC. Trdijo, da se pogostost MMC ter njihova sposobnost diferenciacije zmanjšuje s starostjo osebka, iz katerega osamimo MMC (D’Ippolito in sod., 1999).



Slika 1: Mezenhimske matične celice, osamljene iz maščobnega tkiva, imajo sposobnost razviti se v vsa tkiva zarodne plasti (ektoderm, mezoderm in endoderm) ter imajo široko terapevtsko uporabnost (prijejeno po Chase in sod. (2011)).

Pri osamitvi MMC iz kostnega mozga dobimo heterogeno populacijo celic, ki se imenuje angl. *stromal vascular fraction (SVF)* in vsebuje celice hematopoetskega izvora, fibroblaste, MMC, celične ostanke vaskularnega in mišičnega tkiva. Poleg teh celic nekateri menijo, da so prisotne tudi zelo majhne celice, podobne embrionalnim matičnim celicam VSEL (angl. *very small embryonic-like stem cells*) in multipotentne celice prednice odraslega MAPC (angl. *multipotent adult progenitor cells*), za katere ni popolnoma jasno, ali obstajajo v odraslih tkivih ali pa MMC po dediferenciaciji pridobijo lastnosti podobnim EMC ter jih zato opisujemo kot MAPC ali VSEL (Raff, 2003). Zaradi širokega diferenciacijskega potenciala lahko rečemo, da so MMC pluripotentne matične celice, čeprav njihova pluripotentna lastnost ni natančno raziskana (Jiang in sod., 2002).

Prvi dokazi diferenciacijske sposobnosti MMC so bili opisani pri diferenciaciji v tkiva mezoderma: osteoblaste (kosti), hondrocite (hrustanca) in adipocyte (maščoba) (Gregoire in sod., 1998; Pittenger in sod., 1999), nato še v skeletno mišične celice, endotelijalne celice

(Planat-Benard in sod., 2004), srčno mišične celice (Wakitani in sod., 1995) ter tudi v celice endodermalnega in ektodermalnega izvora, kot so hepatociti (Chagraoui in sod., 2003), živčne celice (Woodbury in sod., 2000) in epitelijske celice (Spees in sod., 2003).

Zaradi povečanega števila raziskav terapevtskega potenciala MMC na področju regenerativne medicine se je poročalo o različnih postopkih osamitve in gojenja MMC ter o različnih kriterijih za celične površinske označevalce pri njihovi karakterizaciji (Vemuri in sod., 2011).

Odbor za mezenhimske in tkivne matične celice, del mednarodnega društva za celično terapijo (angl. Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of International Society for Cellular Therapy), je leta 2006 izdal dokument s predlogi o minimalnih kriterijih karakterizacije MMC (Dominici in sod., 2006b). Predlagali so tri kriterije poenotene karakterizacije MMC celic, osamljenih iz različnih tkiv:

- a. Mezenhimske matične celice morajo imeti sposobnost prilepljanja (adherence) na plastiko pri standardnih pogojih gojenja celic v gojitvenih posodicah.
- b. Več kot 95 % osamljene celične populacije MMC mora izražati površinske celične označevalce CD73, CD90, CD105, ne sme pa izražati površinskih označevalcev CD11b ali CD14, CD34, CD45, CD79α ali CD19, HLR-DR specifični za hematopoetske ali endotelijalne celice.
- c. MMC morajo biti sposobne *in vitro* diferenciacije v adipocyte, osteoblaste in hondrocyte.

Zelo pomembna lastnost mezenhimskih matičnih celic je njihova imunska prilagodljivost in imuno-modulatorno delovanje s tem, da zmanjšujejo imunski odziv limfocitov B in T (Aggarwal in Pittenger, 2005). Imunsko prilagodljivost pokažejo pri transplantaciji MMC iz pacienta - darovalca na pacienta – prejemnika, tako da ni potrebna terapija z zaviralcem imunskega sistema, ki blokira histo-kompatibilnega kompleksa (MHC). Imunski sistem prejemnika ne zaznava prisotnosti tujih celic MMC v organizmu zaradi nizkega izražanja kompleksa MHC I in MHC II (Le Blanc in sod., 2003). Natančen mehanizem imuno-modulativnosti MMC ni znan, vendar se predpostavlja, da MMC posredno zavirajo namnoževanje citotoksičnih limfocitov T in celic naravnih ubijalk z izločanjem topnih dejavnikov (Rasmusson in sod., 2003).

Mezenhimske matične celice imajo veliko prednosti predvsem zaradi odsotnosti etičnih zadržkov, številnih virov tkiv, iz katerih jih lahko osamimo, nizke imunogenosti, ne prihaja do nastankov teratomov, kar jih uvršča med najbolj zaželene celice v kliničnih študijah.

2.3 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE IZ MAŠČOBNEGA TKIVA

Maščobno tkivo predstavlja ogromen in enostavno dostopen vir mezenhimskih matičnih celic. V literaturi najdemo sveže osamljeno frakcijo celic iz maščobnega tkiva pod imenom stromalno vaskularna frakcija SVF (angl. *Stromal Vascular Fraction*). V sedemdesetih letih dvajsetega stoletja so se pojavile prve študije o sposobnosti diferenciacije mišjih celičnih linij 4klj 3T3 (maščobnega izvora) *in vitro* (Green in Kehinde, 1974), nato so bile odkrite še druge maščobne celične linije, ki so opisovale SVF pri živalih in človeku ter njihovo sposobnost diferenciacije (Hausman in Campion, 1982; Pettersson in sod., 1985). Z razvojem in optimizacijo pogojev rasti celičnih kultur maščobnega izvora ali SVF so razvili zanimive modele za proučevanje mehanizmov, ki so neposredno vključeni v procesu diferenciacije maščobnih celic t.i. adipociti. Zavedali so se možnosti uporabe v medicini, saj te celice lahko zamenjajo poškodovane celice v organizmu odraslega. Wu in sodelavci so prvi objavili postopek osamitve MMC iz maščobnega tkiva človeka in jih poimenovali predniki adipociti stromalnih celičnih frakcij SVF (Wu in sod., 2001).

Matične celice iz maščobnega tkiva ADSC (angl. *Adipose Derived Stem Cells*) predstavljajo le tretjino SVF, nato od 7 % do 15 % celic pripada celicam hematopoetskega izvora (monociti, limfociti, eritrociti in druge krvne celice), preostali delež pripada predhodnicam adipocitov, fibroblastov, endotelijskim celicam, gladko mišičnim celicam ter celicam imunskega sistema (makrofagi, limfociti, monociti) (Ferroni in sod., 2013; Minteer in sod., 2015). Osamitev ADSC iz stromalne frakcije SFV poteka preko njihove fizikalne sposobnosti prilepljanja na plastične gojitvene posodice, kjer navadno gojimo te celice.

Poleg lažje dostopnosti in enostavne osamitve MMC iz maščobnega tkiva je prisotnost mezenhimskih matičnih celic bistveno večja v tkivu maščobe kot v kostnem mozgu, ki predstavlja zlati standard za vse ostale MMC osamljene iz ostalih tkiv. Izplen osamljenih matičnih celic, merjeno v fibroblastnih kolonijskih enotah CFU-F (angl. *fibroblast colony-formating units*), znaša približno 5 000 CFU-F enot na gram maščobnega tkiva ter od 100 do 1000 CFU-F enot na mililiter aspiracije kostnega mozga (Sakaguchi in sod., 2005), kar predstavlja petkratno razliko v izplenu MMC. Nekateri znanstveniki opisujejo, da ima proliferacijski oz. namnoževalni potencial MMC, osamljenih iz maščobnega tkiva v gojitvenih posodicah, prednost v primerjavi z MMC, osamljenih iz kostnega mozga (Puissant in sod., 2005). Povprečni delitveni čas MMC iz maščobnega tkiva v celični kulturi je od tri do pet dni (Guilak in sod., 2006).

Zaradi večjega števila MMC iz maščobnega tkiva je gojenje bistveno lažje, enostavnejše in hitrejše. Poleg tega se senescanca pojavi kasneje kot pri MMC, osamljenih iz kostnega mozga (Izadpanah in sod., 2006; Kern in sod., 2006; Schaffler in Buchler, 2007). Schaffler in Buchler (2007) opisujeta dejavnike, ki vplivajo na namnoževalne in diferenciacijske sposobnosti ADSC, kot so gostota nasaditve celic, vrsta in lokacija maščobnega tkiva, starost

darovalca tkiva, način pridobivanja tkiva in seveda pogoji gojenja celic. Na pogoje gojenja največ vpliva gojišče in število pasaž gojenih celic v gojitvenih posodic.

Fenotipski profil karakterizacije ADSC s celičnimi označevalci še vedno ni natančno definiran, vendar je njihov profil skoraj 90 % podoben profilu celičnih označevalcev ostalih mezenhimskih matičnih celic, kot so: CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD54, CD55, CD71, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 in STRO-1. ADSC si delijo nekatere površinske označevalce s fibroblasti in periciti, ki pa so negativni za celice hematopoetskega izvora: c-kit, HLA-DR, CD4, CD11b, CD14, CD16, CD45, CD56, CD62E, CD79, CD104, CD117, CD106 ter endotelialne označevalce: CD31, CD144 in von Willebrandov faktor (McIntosh in sod., 2006; Zuk in sod., 2002).

Z nasaditvijo in gojenjem ADSC v celičnih kulturah se zniža izražanje naslednjih označevalcev: CD34, MHC razred I in II molekul, CD80, CD86, CD45, CD11a, CD14, CD117, HLA-DR, CDKN1B, INS, ITGA5, NOG, UTF1, WNT6, WNT8A in poviša izražanje naslednjih označevalcev: CD9, CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90, CD105, CD166, ACTG2, ACVR1, BMPR2, CTNNB1, CCNE1, CDH1, COL6A2, HSPA9, IL6, ITGA8, ITGB1, ITGB5, MDM2, PTEN, PUM2, SNAI2, TGFBR1 in VEGF-A (Bailey in sod., 2010). Karakterizacija ADSC je zelo pomemben korak za nadaljnjo uporabo teh celic v tkivnem inženirstvu in regenerativni medicini.

2.4 OSAMITEV MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IZ MAŠČOBNEGA TKIVA PSA

Postopek odvzema koščkov maščobnega tkiva iz psa poteka na zelo ne-invaziven način, z liposukcijo, biopsijo ali manjšim kirurškim posegom v lokalni anesteziji (Vieira in sod., 2010). Obstajajo različni postopki osamitev MMC iz maščobnega tkiva, vendar se bomo osredotočili samo na postopke, ki opisujejo osamitev pasjih MMC iz maščobnega tkiva. S postavljivijo pogojev vzdrževanja osamljenih MMC in njihovo karakterizacijo se je število strokovnih objav bistveno povečalo (Guercio in sod., 2012; Hodgkiss-Geere in sod., 2012; Kisiel in sod., 2012; Leein sod., 2014; Martinello in sod., 2011; Vieira in sod., 2010).

Raziskovalna skupina Neupane s sodelavci je bila prva, ki je objavila prilagojen postopek osamitev MMC iz maščobnega tkiva psa in pokazala njihovo sposobnost pritrjevanja na plastične gojitvene posodice. Poleg tega so pokazali tudi izražanje pluripotentnih genov in njihovo sposobnost transdiferenciacije v osteoblaste in adipocite (Neupane in sod., 2008).

Za karakterizacijo osamelih celic MMC se uporablja kvalitativne in kvantitativne metode, ki temeljijo na osnovi specifične vezave protiteles na ciljni protein. Povišana proizvodnja pasjih specifičnih protiteles je omogočila podrobnejšo karakterizacijo površinskih označevalcev, ki so značilni za matične celice iz maščobnega tkiva psa. Na tak način so

pokazali podobnost med MMC, osamljenih iz kostnega mozga in maščobnega tkiva, saj vse celice izražajo CD44, CD90 in MHC I ter ne izražajo CD14, CD29 in MHC II (Screven in sod, 2014). Med postopkom osamitve MMC je zelo pomembna stopnja namnoževanja celic, saj je odvisna od pogojev okolja.

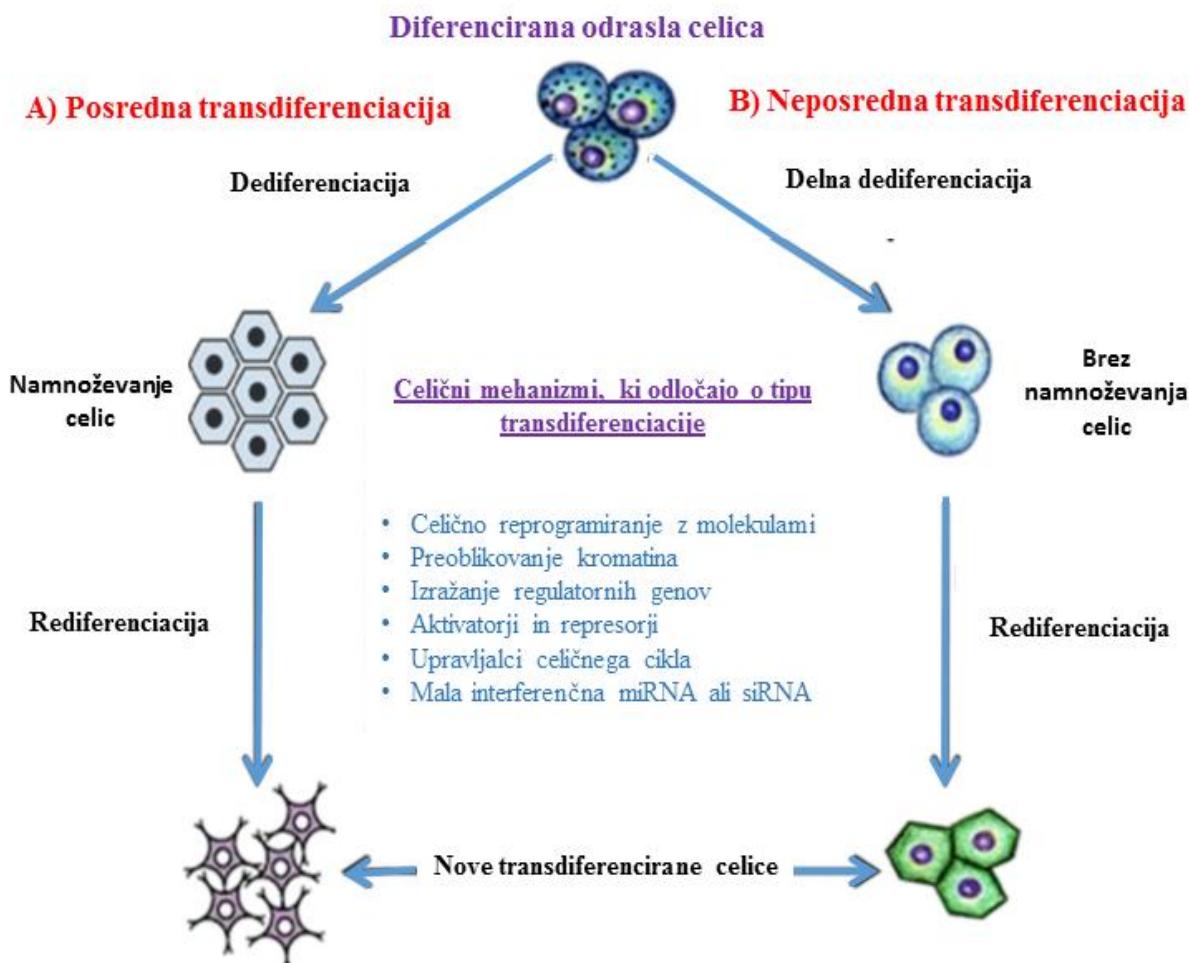
Vieira in sod. (2010) so poročali, da so matične celice iz maščobnega tkiva sposobne namnoževati se do 10 pasaže brez kariotipskih sprememb. Nasprotno so Lee in sodelavci pokazali, da se delitveni čas in diferenciacijska sposobnost pasjih MMC iz maščobnega tkiva zmanjšuje po 5 pasaži (Lee in sod., 2014). Približno $0,25 - 0,375 \times 10^6$ celic/ml razgrajenega maščobnega tkiva (Schwarz in sod., 2011) pridobimo iz koščka tkiva maščobe, odvzetega s strani veterinarja.

2.5 TRANSDIFERENCIACIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC

Z razvojem klasičnih raziskav o morfologiji celic so znanstveniki žeeli raziskati, ali se lahko že diferencirane celice spremenijo v drug tip celic. Leta 1922 sta Maccarty in Caylor na tumorjih jajčnikov pokazala, da se lahko en celični fenotip spremeni v drug fenotip. Pojav tega fenomena so opisali z izrazom metaplasmija ter verjeli, da nastane kot celični odgovor fiziološkega stresa (Maccarty in Caylor, 1922).

Izraz transdiferenciacija sta prvič uporabila znanstvenika Selman in Kafatos (1974), nato pa še Eguchi in Okada (1973), ki jsta opisala pretvorbo kokošjih celic mrežnice v vlakna očesne leče. Danes je izraz transdiferenciacija uvrščen v plastičnost matičnih celic, pri katerem se diferencirane celice tkiva odraslega spremenijo v specializirane celice drugega tkiva, pri tem pa izgubijo fenotip prvega in pridobijo nove fenotipske lastnosti novega tipa (Tosh in Horb 2004). Z razvojem celične in molekularne biologije so se povečale raziskave o mehanizmu delovanja procesa transdiferenciacije kot tudi njegova vključitev v tkivnem inženirstvu, v obliki celičnega zdravljenja. V osnovi je transdiferenciacija naravni proces, ki preko celičnega reprogramiranja pomaga organizmu obnoviti poškodovane celice pri vseh živih bitjih (Sisakhtnezhad in Matin, 2012).

Poznamo neposredni (direktni) in posredni (indirektni) mehanizem transdiferenciacije. Pri posrednemu mehanizmu transdiferenciacije so opazne trajne spremembe v izražanju genov brez mitotskih sprememb. V tem primeru celice preidejo v dediferencirano stanje, se naprej namnožujejo in imajo drugačne lastnosti z začetnim in končnim celičnim fenotipom. Nato sledi proces rediferenciacije v nov tip celic s končnim fenotipom. Neposredni mehanizem transdiferenciacije omogoča dediferenciacijo brez namnoževanja celic, pri tem ni nobenega vmesnega stanja in celica hitro izgubi svoj prvotni fenotip. Podobno kot pri neposrednem mehanizmu sledi proces rediferenciacije celic v nov celični fenotip (Sisakhtnezhad in Matin, 2012).



Slika 2: Poti trasdiferenciacije celic (prijejeno po Sisakhtnezhad and Matin, (2012)).

2.5.1 Transdiferenciacija mezenhimskih matičnih celic psa

Proces transdiferenciacije matičnih celic iz maščobnega tkiva je tesno povezan s celičnim reprogramiranjem, ki omogoča spremembe znotraj delitvenega cikla celic. Na splošno lahko rečemo, da transdiferenciacijo prepoznamo, ko opazimo prve morfološke spremembe v strukturi celic ali preoblikovanje kromatina ali preko spremeljanja izraženih genov po transdiferenciaciji (Yu in sod., 2011).

Sposobnost transdiferenciacije MMC je potrjena s strani raziskovalnih skupin, najbolj raziskani so osteo-, hondro- in adipotransdiferencijski potenciali. Pregled vseh raziskav, ki opisujejo transdiferencijski potencial MMC iz več različnih virov pasjih tkiv do leta 2016, je opisan v **preglednici 2**.

Preglednica 2: Pregled obstoječih podatkov za karakterizacijo MMC iz pasjih tkiv po literaturi. Oznaka – pomeni, da ni podatkov v literaturi (Bakker in sod., 2014).

Raziskave	Izvor MMC	Celični označevalci	Označevalci genskega izražanja	Transdiferencijski potencial
Kim in sod., 2014	Amnijska tekočina	-	NEFL, GFAP, NSE, TUBB3, B2M	Nevro-
Chung in sod., 2013	Maščobno tkivo	-	Nanog, Oct4 in Sox1	Nevro-
	Kostni mozeg			
Guercio in sod., 2012	Maščobno tkivo	-	Nanog, Oct4 in Sox2	Osteo-, Hondro-in Adipo-
Hodgkiss-Geere in sod., 2012	Kostni mozeg	Pozitivno: CD44, STRO-1 Negativno: CD34, CD45	-	Hondro-
Kangin sod., 2012	Kostni mozeg	Pozitivno: CD44, CD73, CD90, CD105 Negativno: CD14, CD34, CD45	-	Osteo-
	Maščobno tkivo			
	Popkovnica			
	Želatinska tekočina znotraj popkovnice (angl. <i>Wharton's jelly</i>)			
Kisiel in sod., 2012	Kostni mozeg	Pozitivno: CD90, CD44 Negativno: CD34, CD45, CD146	Nanog, Oct4 in Sox3	Osteo- in Adipo-
	Maščobno tkivo			
	Mišica			
	Periosteum			
Takemitsu in sod., 2012	Kostni mozeg	Pozitivno: CD29, CD44, CD90 Negativno: CD34, CD45, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81	Nanog, Oct3/4	Osteo- in Adipo-
	Maščobno tkivo			
Martinello in sod., 2011	Maščobno tkivo	Pozitivno: CD90, CD44, CD140a, CD117 Negativno: CD34, CD45	-	Osteo-, Adipo-in Mio-
Vieira in sod., 2010	Maščobno tkivo	Pozitivno: CD44, CD29, CD90 Negativno: CD14, CD34, CD45, CD117	-	Osteo-, Hondro-, Adipo- in Mio-

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 2

Raziskave	Izvor MMC	Celični označevalci	Označevalci genskega izražanja	Transdiferencijski potencial
Neupane in sod., 2008	Maščobno tkivo	-	Nanog, Oct4 in Sox2	Osteo-, Hondro- in Adipo-
Csaki in sod., 2007	Kostni mozeg	Pozitivno: CD90, MHC-I Negativno: CD34, CD45, MHC-II	-	Osteo-, Hondro- in Adipo-
Kamishina in sod., 2006	Kostni mozeg	Pozitivno: CD105, CD90 Negativno: CD45, CD35	-	Nevro-

2.6 NEVROTRANSDIFERENCIACIJA

Čeprav obstaja veliko raziskav, ki opisujejo sposobnost transdiferenciacije odraslih matičnih celic v različne tipe celičnih linij ali tkiv, ostaja njihova lastnost plastičnost in uporaba v regenerativni medicini pod vprašajem. Transdiferenciacija MMC v celičnih linijah živčnega sistema lahko poteka *in vitro* in *in vivo* (Yu in sod., 2011).

Pri *in vitro* nevrotransdiferenciaciji raziskovalne skupine uporabljajo mešanico različnih citokinov brez dodatkov serum. Druga možnost je uporaba kemikalij (BHA, DMSO, BME, retinojska kislina itd.), ki spodbujajo tvorbo nevrosfernih komponent ter nato nadaljujejo s citokinsko spodbujevanje celic (npr. BDNF, bFGF, bEGF). Tretja možnost je uporaba snovi, ki zvišujejo nivo izražanja koncentracije cAMP znotraj celic (Sago in sod., 2008).

Na splošno velja, da kemične snovi spodbujajo le prehodne morfološke spremembe celic s povišanim izražanjem nekaj več nevroloških označevalcev (Croft in Przyborski 2006; Woodbury in sod., 2000), medtem ko rastni dejavniki spodbujajo posebne in dolgotrajne nevrološke spremembe (Jiang in sod., 2002). Trajne nevrološke spremembe dosežemo le po nasaditvi trandiferenciranih celic v kulturi, kjer se nahajajo že diferencirane astro/glia ali živčne celice (Jiang in sod., 2003; Sanchez-Ramos in sod., 2000; Wislet-Gendebien in sod., 2005).

Revolucionarni dosežek transdiferenciacije mezenhimskih matičnih celic v celice živčnega sistema so prvi opisali Woodbury in sodelavci leta 2001. Osamili so matične celice iz kostnega mozga podgane in človeka ter te celice tretirali z 1 mmol/L β -merkaptoetanol (BME). Tako tretirane celice so bile morfološko podobne odraslim nevronom in so izražale nevronsko specifično enolazo (NSE) (Woodbury in sod., 2000). Ashijan in sodelavci so

priredili protokol Woodbury tako, da so namesto BME uporabili inzulin, indometacin (INN) in 3-izobutil-1-metilksantin (IBMX) (Ashjian in sod., 2003; Zuk in sod., 2002).

Kljub spremembam te raziskave niso dale dokončnega odgovora o uspešnosti transdiferenciacije, ker niso bile karakterizirane z odraslimi živčnimi označevalci, poleg tega niso bile opravljene meritve elektrofizioloških lastnosti celic (Kokai in sod., 2005). Izvedena je bila raziskava, pri kateri so dokazali, da je postopek za trandiferenciacijo MMC v celice živčnega sistema posledica citoplazmatskih sprememb, ki jih povzroča depolarizacija F-aktina in ne razširitev mikrotobularnih elementov (Neuhuber in sod., 2004).

Pri naslednjemu konceptu transdiferenciacije MMC so uporabili kombinacijo različnih kemikalij: butil-hidroksianizol (BHA), kalijev klorid (KCl), valproična kislina, forskolin, hidrokortizol in inzulin. Uspešno so pokazali izražanja markerjev GFAP, MAP2 in β -III tubulina, poleg tega pa so potrdili prisotnost napetostnih kalcijevih kanalčkov (Safford in sod., 2002).

Sago in sod. (2008) so prvi raziskovali *in vitro* nevrotransdiferencijski potencial pasjih MMC iz maščobnega tkiva. Uporabljali so gojišče, ki je vsebovalo 100 μM 2-butiril ciklični adenozin monofosfat in 125 μM IBMX. Poročali so o sposobnosti transdiferenciacije ADSC v živčne celice in o prvih poskusih regenerativne terapije za rekonstrukcijo živčevja (Sago in sod., 2008).

Alternativna možnost za uspešno transdiferenciacijo MMC v živčne celice je dodatek rastnih dejavnikov, kot so majhne citokinske molekule: trombocitni rastni dejavnik (PDGF), bazični fibroblastni rastni dejavnik (bFGF) skupaj z BME. Transdiferencirane celice poleg morfoloških sprememb izražajo tudi specifične celične označevalce S100, GFAP, p75 in β -III tubulin (Kingham in sod., 2007; Di Summa in sod., 2010).

BME je kemijska snov, ki zelo toksično deluje na celice in neposredno vpliva na njihovo viabilnost. Nekateri znanstveniki opisujejo podobni učinek, vendar z boljšim izidom, v viabilnosti celic pri uporabi DMSO (Neuhuber in sod., 2004) namesto BME. V **preglednici 3** je prikazan pregled postopkov, ki jih najdemo v literaturi, povezani s transdiferenciacijo MMC v celice živčnega sistema.

Najbolj uspešno objavljeni postopki o nevrotransdiferenciaciji vsebujejo kombinacijo bazičnega fibroblastnega dejavnika bFGF in bazičnega epidermalnega rastnega dejavnika bEGF, pri čemer nastanejo vmesne nevrosferne tvorbe. Nato celice še dodatno tretirajo z nevrotvornim dejavnikom (N2), B27 dodatkom in/ali v kombinaciji z retinojsko kislino (Anghileri in sod., 2008; Razavi in sod., 2013; Zemelko in sod., 2013).

Preglednica 3: Pregled postopkov transdiferenciacije MMC v živčne celice in uporabljeni diferenciacijski gojišča od leta 2000 do 2016.

Izvor	Tip celic	Nasaditvena gostota celic	Sestavni elementi v gojišču	Novi tip celic	Referenca	Leto
Miš / Človek	Kostni mozeg	8000 celic/cm ²	2 % DMSO; 200 mM BHA; 1 do 10 mM BME	živčne celice	Woodbury in sod., 2000	2000
Človek	Maščoba	1 x 10 ⁵ celic/cm ²	2 % b27 suplement, 50 ng/ml (NGF, BDNF, NT-3); 50 ng/ml EGF ; FGF	nevrosferi/ živčne celice / glia	Ferroni in sod., 2012	2012
Miš	Maščoba	2 x 10 ⁴ celic/cm ²	N2 nevrobasal, 10 ng/ml BDNF, 10 ng/ml RA	živčne celice	Bossio in sod., 2013	2013
Človek	Maščoba	/	100 µM BHA; 10–6 M RA, 10 ng/ml EGF 10 ng/ml bFGF,	živčne celice	Johano Cardozo in sod., 2012	2012
Pes	Maščoba	0,5 x 10 ⁴ celic/cm ²	100µM dbcAMP; 125µMIBMX	živčne celice	Sago in sod., 2007	2007
Človek	Maščoba	30 x 10 ⁶ celic/cm ²	10 ng/mL BDNF; 0,75 mM trans RA; EGF; FGF	nevrosferi	Anghileri in sod., 2008	2008
Človek	Maščoba	5 x 10 ⁵ celic/cm ²	EGF, FGF, 25 µM fluvastatin, B27; N2 gojišče; 5-azacitidin	Švanove celice živčnega sistema	Cheng in sod., 2011	2011
Človek	Maščoba	8000 celic/cm ²	N2 gojišče; 1mM BME	živčne celice	Zuk in sod., 2002	2002
Pes	Maščoba	8000 – 10000 celic/cm ²	200 µM BHA; 5 mM KCL; 2 mM valproična kislina; 10 µM forskolin; 1 µM hidrokortizol in 5 µg/mL inzulin	živčne celice/ glia	Sung-Su Park in sod., 2012	2012
Človek	Maščoba	1 x 10 ⁵ celic/cm ²	2 % DMSO; 200 mM BHA; 1 do 10 mM BME	živčne celice	Ahmadia in sod., 2012	2012
Človek	Maščoba	/	20 ng/ml bFGF; 20 ng/ml hEGF; 1 % L-glutamin; 1 % ne-esencialne amino kisline; 1 % N2; 2 % B27			
Miš	Maščoba	/	F12 suplement; 5 M forskolin, 200 ng/ml heregulin; 10 ng/ml bFGF; 5 ng/ml PDGF-AA; 35 ng/ml RA	Švanove celice živčnega sistema	Tong in sod., 2010	2010
Balb c Miš	Maščoba	5 x 10 ⁴ celic/cm ²	250 nM deksametazon; 66nM inzulin; 0,5mM IBMX	živčne celice	Taha in Hedayati 2010	2010

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 3

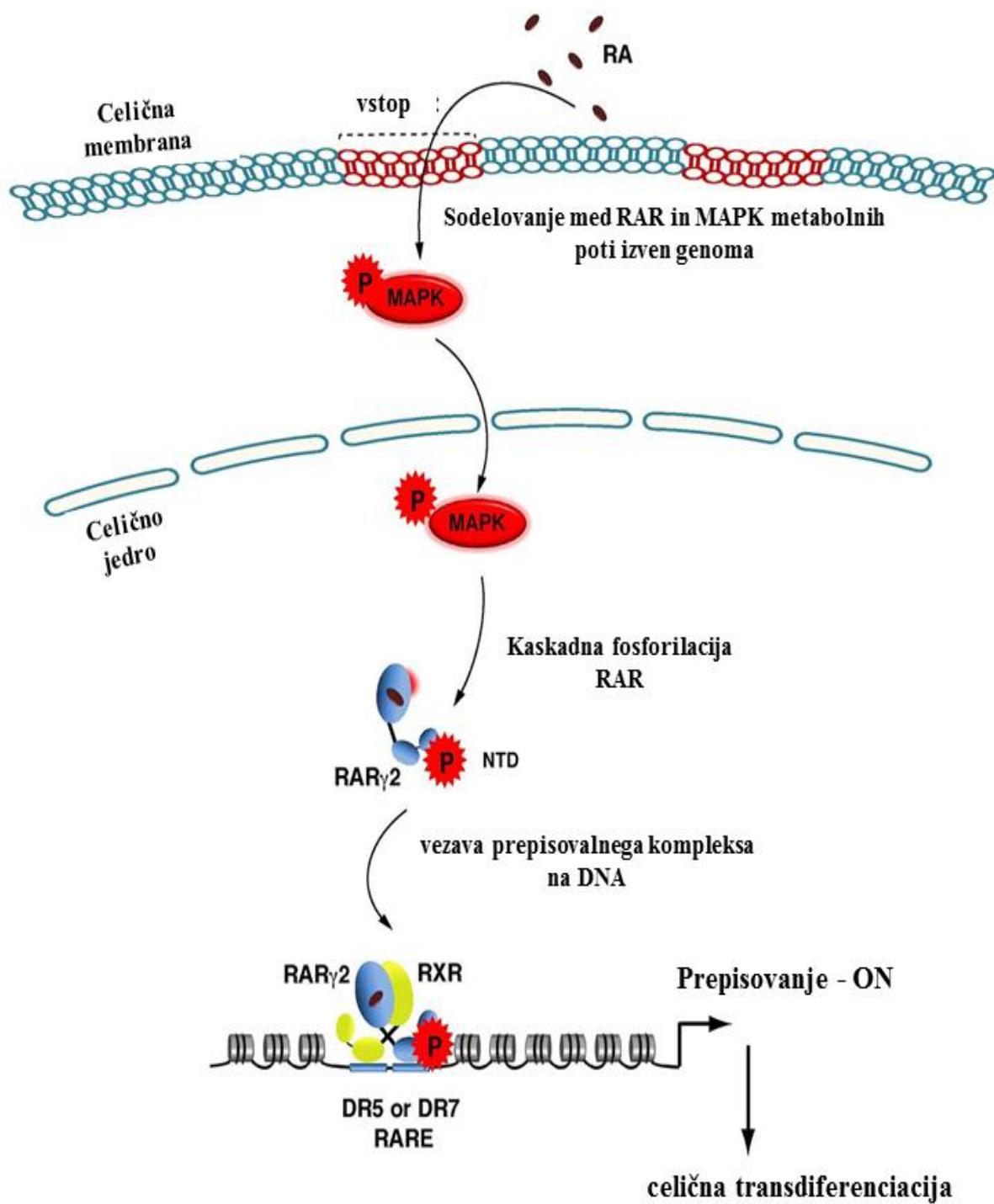
Izvor	Tip celic	Nasaditvena gostota celic	Sestavni elementi v gojišču	Novi tip celic	Referenca	Leto
Človek	Maščoba	4×10^3 celic/cm ²	1 mM BME za 24 ur. Zamenjajo z medijem, ki vsebuje 35 ng/ml vse-trans-RA. Po 72 urah zamenjajo z medijem, ki vsebuje: 5 ng/ml PDGF; 10 ng/ml b-FGF; 5,7 mg/ml forskolin in 200 ng/ml recombinantni človeški protein heregulin-b1 HRG-b1	Švanove celice živčnega sistema	Tomita in sod., 2013	2013
Človek	Maščoba	3×10^5 celic/cm ²	1 % glutamax; 1 % B27; 1 % N2; 25 ng/mL bFGF; 25 ng/mL EGF. Po dveh dneh so dodali novo gojišče z 1 µM RA; 0,25 mM IBMX;	živčne celice	Zemelkob in sod., 2013	2013
Človek	Maščoba	3×10^5 celic/cm ²	1 % glutamax; 1 % B27; 1 % N2; 250 ng/mL SHH; 50 ng/mL bFGF; 100 ng/mL FGF8. Po dveh dneh so dodali medij z 1 µM RA in 0,25 mM IBMX	živčne celice	Villagran in sod., 2014	2014
Miš	Maščoba	$8 \text{ do } 10 \times 10^6$ celic/cm ²	1 mM BME za 24 ur. Nato so zamenjali gojišče z 2 % DMSO; 200 µM BHA	živčne celice	Luo in sod., 2015	2015
Človek	Maščoba	/	7 dnevno tretiranje z 100 ng/ml bFGF nato še 7 dni tretiranja z 10 µM forskulinom	živčne celice	Jang in sod., 2015	2015
Pes	Maščoba	/	»Neurogenic Differentiation Medium (PromoCell GmbH, Germany)«	živčno podobne celice	Roszek in sod., 2016	2016

2.6.1 Retinojska kislina, vpletena v procesu nevrotransdiferenciacije MMC v živčne celice

Retinojska kislina (RA; angl. *retinoic acid*) je metabolit vitamina A, ki ima veliko vlogo pri regulaciji presnovnih poti, ki so vključene v delitve celice in diferenciaciji med embrionalnega razvoja. RA je postala pomembni dejavnik pri izvajanju novih transdiferencijskih pristopov, saj se je izboljšala sposobnost pretvorbe odraslih celic v živčne celice (Frey in Vogel 2011). Retinojska kislina ima sposobnost aktivacije post-mitotičnega, nevralnega fenotipa *in vitro* v različnih matičnih celicah, kar potrjuje teorijo o njenem sodelovanju pri preklopu med namnoževanjem in diferenciacijo celic (Kim in sod., 2002; Sanchez-Ramos in sod., 2000). Z odkritjem specifičnih genov so ugotovili njenou sposobnost transdiferenciacije embrionalnih matičnih celic in embrionalnih rakastih celic v živčne celice (Spinella in sod., 2003). Vse-trans oblike retinojske kisline in ostali izoformi (9-cis, 11-cis, 13-cis) so produkti metabolnih poti retinola.

Vsi nastali produkti se s skupnim imenom imenujejo retinoidi. Novo nastali retinoidi delujejo kot medcelične signalne molekule, ki omogočajo komunikacijo s sosednimi celicami (Gudas in Wagner, 2011). Nekateri znanstveniki so pokazali, kateri geni in metabolne poti so vključene pri aktivaciji in pretvorbi odraslih celic v živčne celice (Aruga in Mikoshiba 2011; Marchal in sod., 2009). Retinojska kislina ima pomembno vlogo pri celični diferenciaciji, saj se lahko veže kot ligand na RAR receptorje (α , β and γ), ki sodelujejo s RXR receptorji in se skupaj vežejo na RARE operon na DNA molekuli. Po vezavi pride do prepisovanja proteinov, ki so pomembni pri celični transdiferenciaciji (**Slika 3**).

Potek komunikacije med proteini in prepisovalnimi dejavniki poteka s pomočjo fosforilacije RAR γ 2 in sodelovanjem z MAPK kompleksom (Barber in sod., 2014). Ob nastanku RAR/RXR kompleksa pride do: 1. sodelovanja z drugimi zaviralnimi in aktivatorskimi proteini, ki so ključni pri prepisovanju ciljnih genov, vključenih pri transdiferenciaciji in nastanku novih proteinov; 2. nadzoruje in spreminja interakcije s proteini, ki sprožajo epigenetske spremembe; 3. dodatno spodbuja prepisovanje genov (npr. FOX03A, Hoxa1, Sox9, TRAIL, UBE2D3), ki kodirajo prepisovalne dejavnike in signalne proteine; 4. povzroči spremembe v signalizaciji estrogenskih α receptorjev. V bližini RARE operona se vežejo proteini N-CoR1, PRAME, Trim24, NRIP1, Ajuba, Zfp423 in MN1/TEL, ki imajo ključno vlogo pri transdiferenciaciji matičnih celic z retinoidi (Gudas in Wagner, 2011). S proučevanjem kaskadne reakcije, ki se sproži ob dodatku retinoidov v celice, lahko povečamo razumevanje procesa transdiferenciacije matičnih celic, namenjenih za terapijo in zdravljenja nevrodegenerativnih bolezni.



Slika 3: Prikaz metabolnih poti, proteinov in genov, ki so vključeni pri transdiferenciaciji MMC v živčne celice. (prirejeno po Al Tanoury in sod. (2014)).

2.7 UPORABA MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IZ MAŠČOBNEGA TKIVA V BIOMEDICINI

Mezenhimske matične celice veljajo za najbolj obetajoči tip celic za terapevtske namene predvsem v regenerativni medicini. Tkvno inženirstvo predstavlja hitro rastoče področje regenerativne medicine, ki vključuje interdisciplinarne (biološke in inženirske) pristope za razvoj organskih nadomestkov. V veterinarski medicini so aplikacije, povezane z matičnimi celicami za uporabo v regenerativni medicini in tkivnim inženiringom, pokazale hiter napredek tako v eksperimentalnih poskusih kot v kliniki (Chanda in sod., 2010).

Poleg matičnih celic se vključuje tudi uporaba celičnih nosilcev iz bioloških materialov, s katerim se lahko pripravi 3D struktura določenega tkiva (Gimble in sod., 2007). Celični nosilci ohranjajo viabilnost celic, preprečijo odvajanje celic iz mesta poškodbe, podpirajo namnoževanje in omogočajo medcelično komunikacijo z rastnimi dejavniki. Ponavadi so sestavljeni iz različnih bioloških materialov, kot so alginat, hitozin, hialuronska kislina, polietilen glikol, fibrin itd. Zaradi uporabnosti in obetajočih alternativnih terapij za zdravljenje številnih bolezni se je povečalo število podjetij, ki ponujajo terapije za zdravljenje psov, mačk in konjev po celem svetu (**Preglednica 4**). Povečano število aplikacij v veterinarski medicini odpira veliko možnosti o prenosu pridobljenega znanja tudi za zdravljenje človeških bolezni (Marx in sod., 2015).

Preglednica 4: Pregled vodilnih podjetij v veterinarski medicini, ki ponujajo zdravljenje bolezni z matičnimi celicami iz maščobnega tkiva domačih živali (prirejeno po Max in sod., (2015)).

IZVORNO IME PODJETJA	DRŽAVA	SPLETNA POVEZAVA
Animacel	Slovenija	www.animacel.com
Animal Cell Therapies	ZDA	www.actcells.com
Austinburg Veterinary Clinic	ZDA	www.austinburgvetclinic.com
Australian Veterinary Stem Cells	Avstralija	www.australianstemcells.com.au
BIO–Bio Tecnologia Animal	Brazilija	www.labbiocell.com
CellMed Medicina Regenerativa Ltda	Brazilija	www.cellvet.com.br
Celltrovet Medicina Veterinaria Regenerativa	Brazilija	www.celltrovet.com.br
Fat Stem	Belgija	www.fat-stem.be
Innova Celulas Madres	Kostarika	www.es-es.facebook.com/InnovaCelulasMadre
Medivet America	ZDA	www.medivet-america.com
RenovoCyte	ZDA	www.renovocyte.com
Stemcellvet	Anglija	www.stemcellvet.co.uk
Stemlogix, LLC	ZDA	www.facebook.com/stemlogix
Stemvet NZ Ltd.	Nova Zelandija	www.stemvet.co.nz

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 4

IZVORNO IME PODJETJA	DRŽAVA	SPLETNA POVEZAVA
Tierärztliche Klinik für Pferde Grosswallstadt	Nemčija	www.pferdeklinik-grosswallstadt.de/
Vet-Stem Regenerative Veterinary Medicine	ZDA	www.vet-stem.com
Vetbiobank	Francija	www.vetbiobank.com
Veterinaria Portal Mayor	Čile	www.veterinariaportalmayor.cl

Nevrodegenerativne bolezni, kot so Parkinsonova bolezen, Alzheimerjeva bolezen in multipla skleroza, predstavljajo velik problem predvsem v razvitih državah, saj se število starejših ljudi vsak dan povečuje (Kitambi in Chandrasekar, 2011). Mezenhimske matične celice lahko pripomorejo k iskanju rešitev pri zamenjavi poškodovanih celic s pomočjo regenerativne medicine ali pa preko postavitve farmacevtske platforme pri razvoju novih zdravil pri zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni (Ranga in sod., 2014).

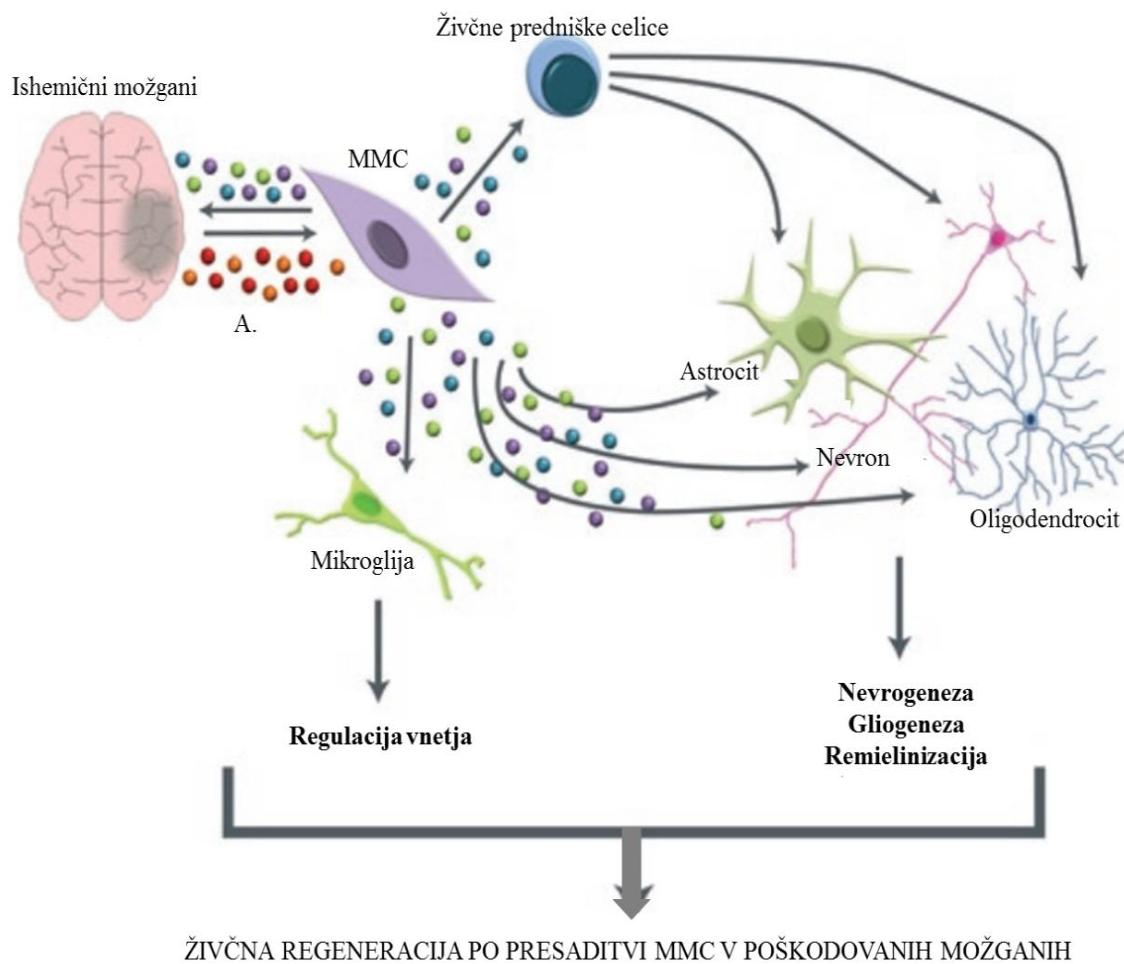
Modeliranje bolezni pripomore k zmanjšanemu številu laboratorijskih živali v kliničnih študijah. Pes se je izkazal kot najbolj primerni model v predkliničnih raziskavah, saj je morfološko zelo podoben človeku (Smith, 2008). V resnici obstaja le nekaj raziskav o uporabnosti mezenhimskih matičnih celic za zdravljenje kostnih in hrustančnih težav pri psih (Guercio in sod., 2012; Hiyama in sod., 2008). Predkliničnih raziskav o uporabi transdiferenciranih pasjih MMC v celice živčnega sistema v literaturi nismo zasledili. Zato pa obstajajo raziskave, ki opisujejo možnost uporabe MMC pri obnavljanju živčnih celic pri neonatalni ishemični poškodbi možganov.

2.7.1 Uporaba mezenhimskih matičnih celic pri zdravljenju neonatalne ishemične poškodbe možganov

Prve raziskave, ki opisujejo uporabo MMC pri zdravljenju ishemične poškodbe možganov, potencirajo sposobnost MMC, da nadomeščajo poškodovane celice tako, da se presadijo na mesto poškodbe in transdiferencirajo v živčne celice (Mezey in sod., 2000; Kopen in sod., 1999). V zadnjem času je pozornost preusmerjena k sposobnosti MMC, da spodbujajo aktivacijo endogenih trofičnih mehanizmov (Caplan in sod., 2006; Zhang in sod., 2009; van Velthoven in sod., 2011).

MMC izločajo veliko število prepisovalnih dejavnikov, citokinov in kemijskih molekul, ki vplivajo na pomembne celične procese, kot so apoptoza, nevrogeneza, angiogeneza in sinaptogeneza (Caplan in sod., 2006; van Velthoven in sod., 2010). Po transplantaciji ali vbrizganju MMC na mesto poškodbe so ugotovili, da ima možgansko mikro-okolje ključno vlogo pri določanju odziva MMC in izločanja specifičnih dejavnikov, ki nato spremenijo mikro-okolje. Takoj po nasaditvi MMC v celični kulturi skupaj z ekstrakti ishemično poškodovanih možganov so se celice odzvale s spremembami v izražanju dejavnikov, ki

regulirajo celično namnoževanje, diferenciacijo in staranje možganskih celic. Ugotovili so izražanje multifunkcijskih FGF-2, EGF, glija nevrotrofičnih dejavnikov, ki vplivajo na tvorbo funkcionalnih nevronov na mestu poškodbe.



Slika 4: Mezenhimske matične celice po transplantaciji na mestu poškodovanih ishemičnih možganov omogočajo živčno regeneracijo. A) MMC izločajo rastne in diferenciacijske dejavnike, ki stimulirajo živčne matične celice (NSCs; angl. *neural stem cells*) kot živčne predniške celice, ki spodbujajo regeneracijo. Poleg tega MMC stimulirajo tudi mikroglijo celic, ki regulirajo vnetni odgovor možganov, saj pripomore k uspešnejši živčni regeneraciji (prijejeno po van Velthoven in sod., (2012)).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 KEMIKALIJE, GOJIŠČA, RAZTOPINE, REAGENTI, PROTITELESA, CELIČNI MATERIAL IN LABORATORIJSKA OPREMA

3.1.1 Materiali

- Brizga (10, 20 in 50 ml) (BD Plastipal, Spain)
- Centrifugirke (15 ml in 50 ml) (Corning, ZDA)
- Epruvete za pretočni citometer 5 ml (12 x 75 mm) (BD Falcon)
- Mikrocentrifugirke (1,5 ml in 2 ml)
- Gojitvene posodice, 24 luknjic
- Gojitvene posodice, 25 cm²
- Gojitvene posodice, 6 luknjic
- Gojitvene posodice, 35 mm x 10 mm
- Krioviale
- Krovna stekelca
- Okrogla krovna stekelca
- Pipetni nastavki
- Pinceta
- Petrijevke
- Rokavice
- Serološke pipete (5, 10, 25 in 50 ml)
- Sterilna igla 0,8 x 40 mm (BD Mirolance, Nemčija)
- Sterilni filter
- Skalpel

3.1.2 Kemikalije

- 4 % Paraformaldehid
- 70 % Etanol
- Alexa Fluor® Antibody Labeling Kit
- B27
- BHA
- BSA
- DAPI
- DMEM
- DMSO
- EGF
- FBS
- FGF
- Forskulin
- Glicerol

- Inzulin
- Kozji serum
- Lak za nohte, brezbarvni
- Laminin (Sigma, L2020-1 mg)
- Mleko v prahu
- N₂ tekoči
- O.C.T. medij (Sakura Tissue-Tek)
- PBS
- Penicilin/Streptomicin
- Poli-D-Lizin, (angl.Poly-D-Lysine)
- Retinojska kislina
- Saharoza 30 %
- Tripansko modrilo
- Tripsin
- Triton

3.1.3 Laboratorijska oprema

- Brezprašna komora (Telstar PV - 30/70)
- Burker – Turkova števna komora
- Centrifuga (model Hettich, Nemčija)
- Centrifuga (model Megafuge 10R, ThermoScientific, ZDA)
- CO₂ inkubator (model SANYO)
- Flourescenčni mikroskop, (Nikon eclipse 80i)
- Svetlobni mikroskop (KRUSS, Nemčija)
- Hladilnik (Liebherr)
- Invertni mikroskop (Nikon eclipse TS 100)
- Konfokalni mikroskop (angl. Confocal microscope)
- Kriostat (angl. Cryostat)
- pH meter (Mettler Toledo)
- Pipete (Biohit)
- Pipetor (Accu-jet pro)
- Pretočni citometer (BD FACSCanto™ 3371175)
- Računalniški program (Fluorescenčni mikroskop)
- Računalniški program za pretočni citometer BD FACSDiva 6.1.2
- Računalniški program Zen 2012 (Zeiss, ZDA)
- Tehtnica (Mettler Toledo)
- Stresalnik (Vibromix)
- Termo – blok (Eppendorf)
- Zamrzovalnik (-20 °C) (Liebherr) in Zamrzovalnik (-80 °C) (Sanyo)

3.1.4 Gojišča in raztopine

Pri pripravi gojišč in raztopin je najbolj pomembno zagotoviti sterilne pogoje, saj so pomembni za gojenje celic *in vitro*. Gojišča in raztopine, ki so bila namenjena za gojenje celic, smo pripravljali v brezprašni komori in zatem še filtrirali skozi 0,2 µm filter. Za gojenje mezenhimskih matičnih celic v kulturi smo uporabljali gojišče Animacel. Osamljene MMC se po izolaciji pritrdijo na plastiko. Da bi jih presadili v naslednjo pasažo ali pa pripravili za analizo, smo uporabljali encim tripsin, ki odlepi enoslojne celične kulture z dna gojitvene posode. Za inaktivacijo tripsina smo uporabili gojišče:

- 10 % FBS
- DMEM
- Glutamat
- 0,1 % penicilin/streptomycin

Uporabljali smo gojišče za zamrzovanje celic po ustreznji selekciji MMC celic, ki smo jih osamili iz maščobnega tkiva. Gojišče za zamrzovanje celic je vsebovalo:

- 10 % DMSO
- 20 % FBS
- DMEM

Ob dodatku krioprotektanta DMSO smo vsebino počasi mešali, da ne bi prišlo do precipitacije krioprotektanta. Pripravljeno gojišče smo prefiltrirali skozi 0,2 µm filter in shranili v hladilnik na 4 °C.

Med raziskovalnim delom smo največ časa porabili za optimizacijo postopkov in ustreznih komponent diferencijacijskih gojišč za uspešno transdiferenciacijo MMC v živčne celice. Testirali smo pred-diferencijacijska gojišča, ki omogočijo pripravo MMC za transdiferenciacijo.

Preglednica 5: Pred-diferenciacijska gojišča za pripravo na transdiferenciacijo MMC celic.

STIM 1	STIM 2
EGF (20 µg/ml) in bFGF (20 µg/ml) B27 dodatek. (1 X) DMEM	β-MEtOH (100 µM) 20 % FBS DMEM

Po 24 urah smo zamenjali pred-diferenciacijski medij z diferenciacijskim medijem in spremljali spremembe, najprej pod mikroskopom, nato pa še z molekularnimi metodami.

Preglednica 6: Diferenciacijska gojišča za transdiferenciacijo MMC celic.

KEM	NIM a	NIM b	NIM c
1 % FBS	2 % B27	2 % B27	2 % B27
1 X B27	1 % N2	1 % N2	1 % N2
2 mM valproična kislina	1 % FBS	1 % FBS	1 % FBS
10 µM forskolin	0,1 % penicillin-streptomycin	0,1 % penicillin-streptomycin	0,1 % penicillin-streptomycin
1 µM HYD	10 nM retinojska kislina	100 nM retinojska kislina	10 µM retinojska kislina
5 mM KCL	DMEM	DMEM	DMEM
200 µM BHA			
5 µg/ml inzulin			
DMEM			

Pri optimizaciji smo uporabljali tudi dva difrenciacijska medija:

- 10 mM β-MEtOH 2 % DMSO
- DMEM 200 µM BHA
 DMEM

Raztopina za prekrivanje nespecifičnih epitopov (pH 7,2) na površini celic za specifične označevalce:

A. Za imunocitokemijoB.

- 2 % FBS
- 0,1 % TRITON
- 5 % mleko v prahu
- 0,02 % penicilin/streptamicin

Za imunohistokemijo

- 10 % FBS
- 1 % mleko v prahu
- 0,02 % Na-azide
- TBST (Tween20 + PBS)

Fiksacija celic

- 4 % Paraformaldehid
- D-PBS

Za spiranje fiksiranih celic smo uporabljali:

- 2 % FBS
- D-PBS

Za pripravo tkivnih rezin smo uporabili 30 % saharozo in 0,3 M glicin v PBS.

3.1.5 Protitelesa

Z namenom, da bi dokazali sposobnost transdiferenciacije mezenhimskih matičnih (stromalnih) celic, smo izbrali specifične označevalce za nevrofilament H (NF-H), tubulin beta III, MAP2 in GFAP. Vsi izbrani označevalci so specifični in prisotni v centralnem živčnem sistemu. Kisla fibrilarna beljakovina (GFAP; angl. *Glial Fibrillary Acid Protein*) je označevalec za oporne celice živčnega sistema (Choi in Kim, 1984). Nevrofilament H (NF-H; angl. *Neurofilament H*) je beljakovina citoskeleta, ki je izražena v motoričnih nevronih centralnega živčnega sistema. Pretekle raziskave s humanimi matičnimi celicami in laboratorijskimi glodavci so pokazale, da je nevrofilament H primeren označevalec transdiferenciacije matičnih celic v živčne celice (Yin in sod., 2014). Mikrotubularni protein (MAP2; angl. *microtubule-associated protein 2*) se izraža v citoskeletu odraslih živčnih celic in ima pomembno vlogo pri razvoju in ohranjanju strukture podaljškov živčnih celic, predvsem dendritov (Chamak in sod., 1987). Tubulin β III protein se izraža v citoskeletu in predstavlja glavno sestavno komponento mikrotubulov. Veže dva mola GTP, eno izmenljivo na mestu beta verige in drugo ne izmenljivo mesto na alfa verigi. Tubulin β III igra ključno vlogo pri pravilnem delovanju aksonov (Geahlen in Haley, 1977).

3.1.5.1 Uporabljeni protitelesi za pretočno citometrijo

- ✓ Monoklonsko kunčje protitelo razreda IgG, proti kisli fibrilarni beljakovini; **GFAP** (Sigma, ZDA) označeno z Alexa Fluor 488 (LifeTechnologies, ZDA);
- ✓ Poliklonsko kunčje protitelo razreda IgG, proti nevralnem faktorju; **NF-H** (Merck Millipore, Nemčija);
- ✓ Poliklonsko kunčje protitelo razreda IgG, proti mikrotubularnem proteinu 2; **MAP2** (Chemicon International; Nemčija);
- ✓ Sekundarno oslovo protitelo razred IgG, proti kunčjemu protitelesu razreda IgG (Jeckson Immunoresearch, ZDA).

3.1.5.2 Uporabljeni protitelesi za imunobarvanje

- ✓ Monoklonsko kunčje protitelo razreda IgG, proti kisli fibrilarni beljakovini; **GFAP** (Sigma, ZDA) označeno z Alexa Fluor 488 (LifeTechnologies, ZDA);
- ✓ Poliklonsko kunčje protitelo razreda IgG, proti nevralnem faktorju; **NF-H** (Merck Millipore, Nemčija);

- ✓ Poliklonsko kunče protitelo razreda IgG, proti mikrotubularnemu proteinu 2; **MAP2** (Chemocom International; Nemčija);
- ✓ Sekundarno oslovo protitelo razred IgG, proti kunčemu protitelesu razreda IgG (Jeckson Immunoresearch, ZDA).

3.1.5.3 Uporabljeni protitelesi za imunobarvanje med optimizacijo transdiferencijskega protokola

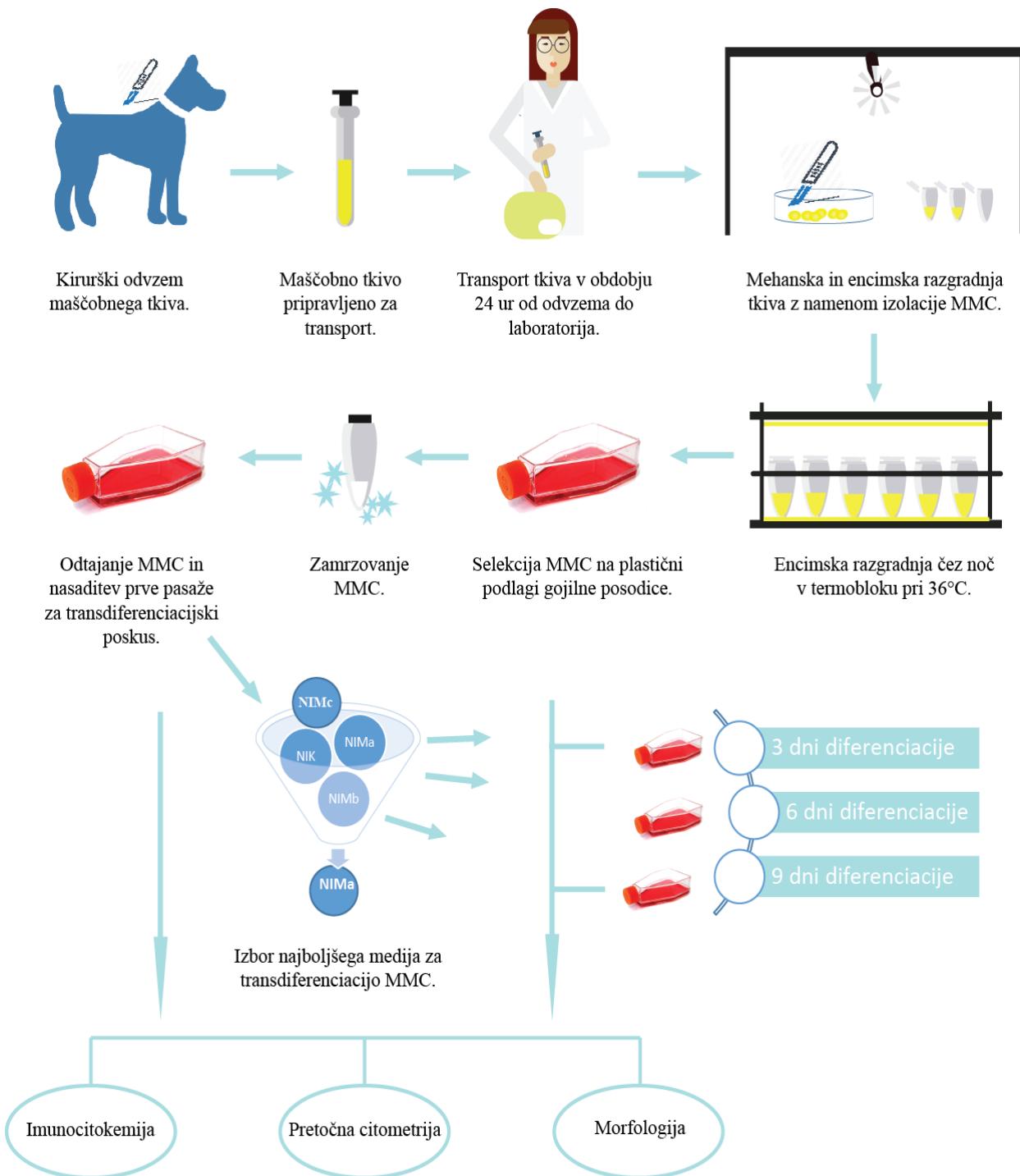
- ✓ Poliklonsko mišje protitelo razreda IgG, proti nevralnem faktorju; **NF-pan** (Merck Millipore, Nemčija);
- ✓ Poliklonsko kokošje protitelo razreda IgG, proti nestinu; **NESTIN** (Abcam, ZDA);
- ✓ Poliklonsko mišje protitelo razreda IgG, proti tubulinu beta III protein; **βIIIITub** (Abcam, ZDA);
- ✓ Monoklonsko kunče protitelo razreda IgG, proti kisli fibrilarni beljakovini; **GFAP** (Sigma, ZDA) označeno z Alexa Fluor 488 (LifeTechnologies, ZDA);
- ✓ Poliklonsko kunče protitelo razreda IgG, proti nevralnem faktorju; **NF-H** (Merck Millipore, Nemčija);
- ✓ Poliklonsko kunče protitelo razreda IgG, proti; proti prepisovalnem faktorju **Pax 6**nevroprogenitor (Abcam, ZDA);
- ✓ Poliklonsko mišje protitelo razreda IgG, proti; proti nevron specifični enolazi **NSE** (DAKO,ZDA);
- ✓ Sekundarno kozje protitelo razred IgG, proti kokošjemu protitelesu razreda IgG – **Alexa 647** (Invitrogen, ZDA);
- ✓ Sekundarno kozje protitelo razred IgG, proti kunčjemu protitelesu razred IgG – **Alexa 488** (Invitrogen, ZDA);
- ✓ Sekundarno kozje protitelo razred IgG, proti mišjemu protitelesu razred IgG – **Cy3** (Jeckson Immunoresearch, ZDA).

3.1.6 Celični material

Glavni vir pridobivanja celičnega materiala je potekal preko podjetja Animacel d.o.o. Uporabili smo vzorce pasjih pacientov, katerih lastniki so podpisali pisno soglasje o uporabi shranjenih matičnih celic v raziskavi. Uporabili smo celice iz 6 različnih pasjih pacientov, tri ženske psice in trije moški psi. Živali so bile stare med 2 in 9 leti in so bile različnih pasem.

3.2 METODE

V sklopu magistrskega dela smo sledili korakom opisanim na **sliki 5.**



Slika 5: Shematski prikaz magistrskega dela od izolacije primarne kulture do transdiferenciacije. Prikazane so tudi časovne točke, pri katerih smo karakterizirali novo nastale celice živčnega sistema.

3.2.1 Pridobivanje vzorcev

3.2.1.1 Maščobno tkivo psa

Pridobivanje vzorcev maščob za raziskavo poteka v sterilnih pogojih veterinarske klinike, kjer veterinar odvzame približno 1 cm³ maščobe. Veterinar s pomočjo kirurških tehnik živali v splošni anesteziji odvzame majhen košček maščobnega tkiva z območja hrbta, bolj natančno med lopaticama psa. Pri tem nastane zelo majhna rana, ki jo je po končanem postopku potrebno ustrezno zašiti. Za raziskovalno nalogo smo uporabili maščobno tkivo šestih različnih psov, starih med 2 in 9 let, treh moškega spola in treh ženskega spola.

Preglednica 7: Število živali, iz katerih so bili osamljene MMC za poskus (M - moški spol; Ž – ženski spol). Podatki z oznako / niso znani.

Število živali	Oznaka/spol	Starost	Pasma
1	AT0615 (M)	9	Labradorec
2	AT0515 (M)	7	Nemški ovčar
3	CRO115 (M)	/	/
4	CRO315 (Ž)	6	Zlati prenašalec
5	SLO115 (Ž)	2	Kratkodlaki retriever
6	AT0215 (Ž)	6	Bernski planšar

3.2.1.2 Pasji možgani

Pasje možgane smo pridobili na Veterinarske fakulteti Univerze v Oslu. Pes je bil star 3 leta ter usmrčen zaradi bolezni notranjih organov. Po 12 urah smo prevzeli vzorec in ga takoj fiksirali v 4 % paraformaldehidu. Vzorec smo ustrezno shranili na 4 °C do nadaljnje stopnje priprave rezin za testiranje protiteles.

3.2.2 Osamitev primarne kulture mezenhimskih matičnih celic

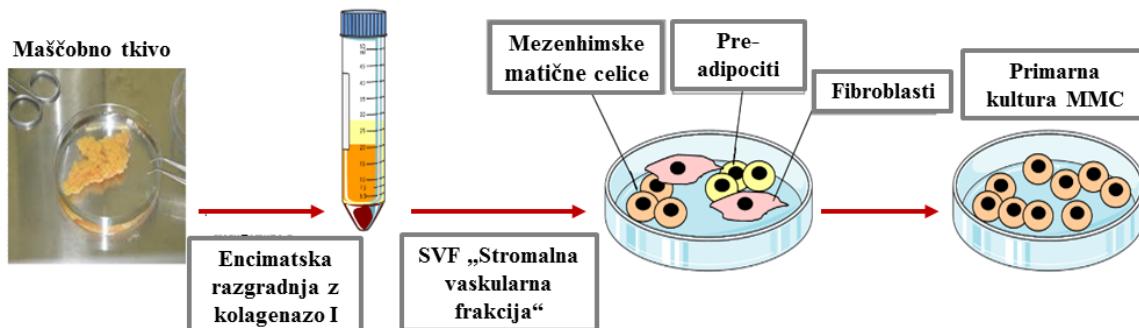
S pomočjo strokovnjakov iz podjetja Animacel smo osamili MMC iz maščobnega tkiva. Uporabljali smo klasično tehniko osamitve celic, ki temelji na adherentnem potencialu MMC na plastiko po 24 urah. Pridobljeno tkivo, opisano v poglavju 3.2.1.1, smo ustrezno sprejeli v celičnem laboratoriju in isti dan nadaljevali z osamitvijo. Od tukaj naprej smo delali v sterilni komori – laminar. Postopek osamitve mezenhimskih matičnih celic iz maščobnega tkiva psa je podrobno opisan in obrazložen glede na strokovne objave v naslednjem poglavju 3.2.3.

3.2.3 Postopek osamitve MMC iz maščobnega tkiva psa

Tkivo je potrebno trikrat sprati z fosfatnim pufrom DPBS (angl. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) z namenom odstranjevanja krvnih ostankov po odvzemu tkiva. Nato tkivo narežemo na 1-2 mm velike koščke s sterilnim skalpelom. Tako razrezano tkivo dodatno

razgradimo s posebno pripravljenim medijem, ki vsebuje encim kolagenaza I. Že od prvega odkritja je encim kolagenaze I postal priljubljen encim za razgradnjo maščobnega tkiva (Rodbell, 1964). Postopek omogoča postopno ločevanje maščobnih celic iz plasti maščobnega tkiva s številnimi spiranji. Nato so sledile raziskave, kjer so v celoti opisali postopek osamitve maščobnih celic (Zuk in sod., 2001). Razgradnja poteka čez noč v vodni kopeli pri 37 °C in počasnem mešanjem pri 60 rpm. Wu in sod. (2001) so prvi opisali medij za razgradnjo maščobnega tkiva psa, ki je sestavljen iz DMEM, 2 mg/ml encim kolagenaza, 4 mg/ml goveji serum BSA in 20 mM HEPES pufra za vzdrževanje vrednosti pH 7,4.

Za uspešno razgradnjo potrebujemo 0,5 g maščobnega tkiva na 1 ml medija za razgradnjo. Naslednji dan razgrajeno mešanico filtriramo skozi najlonski filter z 100 µm velikimi porami, tako da odstranimo velike nerazgrajene kose tkiva in odrasle adipocite. Celično suspenzijo centrifugiramo pri 1400 rpm za 5 minut, nato pelet 2 krat resuspendiramo z DMEM gojiščem, ki vsebuje 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml streptomicina in 10 % BSA. Zelo pomemben korak je odstranjevanje eritrocitov iz celične suspenzije, ki lahko močno ovira pritrjevanje MMC na plastiko (adhejski potencial MMC) ter tudi njihovo nadaljnjo namnoževanje (Gregoire in sod., 1998).



Slika 6: Postopek osamitve mezenhimskih matičnih celic iz maščobnega tkiva psa (prirejeno po Guidotti in sod., (2013)).

Celični pelet po drugem spiranju tretiramo s pufrom za lizo eritrocitov za 10 minut. Sledi ponovno centrifugiranje ter spiranje z zgornjim medijem. Tako sprane celice nasadimo v T-75 cm² gojitveno posodico z rastnim gojiščem, s katerim omogočamo odlične rastne pogoje za naše tarčne MMC. Gojitvene posodice shranimo v inkubator za gojenje celic pri 37 °C, 5 % CO₂. Po 48 urah se mezenhimske matične celice pritrdijo na gojitveno posodico. Z menjavo gojišča se znebimo večjih, ne-adherentnih celic. Tako osamljena kultura celic iz maščobnega tkiva ni popolnoma čista, saj vsebuje veliko fibroblastov in nekaj limfocitov, ki imajo podobno velikost kot MMC (Zuk in sod., 2001).

3.2.4 Tripsinizacija

Mezenhimske matične celice imajo posebno lastnost, da se pritrdijo na dno gojitvene posodice. Da bi vzdrževali njihovo rast, kvantificirali, shranili ali analizirali, je potrebno celice odlepiti iz dna gojitvene posodice. Tripsinizacija je najbolj uporabljen postopek odlepljanja celice iz dna gojitvene posodice z encimom tripsin. Postopek so razvili empirično, ob zavedanju, da encim lahko povzroča določene celične poškodbe (Litwin, 1970).

Gori in sodelavci so razvili samodejno napravo, ki je pomagala pri pridobivanju eksperimentalnih dokazov optimalnega časa delovanja encima na ledvičnih celicah, osamljenih iz opic. Dokazali so, da je optimalni povprečni čas delovanja tripsina med 5 in 8 minut, če je volumen tripsina desetina tretirane celične kulture pri tem, da ne bi poškodovali celice. Poleg tega so ugotovili, da temperatura 36 °C in pH 7,8 dodatno zagotovita optimalne pogoje za preživetje celic (Gori, 1964).

Gojitvene posodice, v katerih rastejo MMC, smo previdno vzeli iz inkubatorja in pogledali pod invertnim mikroskopom, tako da smo ocenili rast celic. MMC smo presadili v novo gojitveno posodico, ko le te dosežejo približno 80 % konfluenco. Ko smo ocenili, da je potrebno celice presaditi, smo najprej tripsin ogreli na 37 °C, saj je temperatura nujna za njegovo delovanje. Nato smo odpipetirali gojišče, v katerem so celice rastle, in sprali s 3 ml predhodno ogretega fosfatnega pufra (PBS) na sobni temperaturi. Spiranje je zelo pomemben korak, saj serum, ki je sestavni del gojišča, inhibira delovanje tripsina. Encim tripsin razgrajuje peptidne vezi med proteini, ki pritrjujejo celice na dno gojitvene posodice. Uporabljali smo tripsin TrypLE™ Express in dodali ustrezni volumen, kot je opisano v spodnji preglednici (**Preglednica 8**).

Preglednica 8: Uporabljeni volumni tripsina in medija glede na velikosti gojitvene posodice.

Tip Gojtvene posodice	POVRŠINA (mm ²)	Število celic ob konfluentnosti	Volumen Tripsina (µl)	Volumen medija (ml)
T-25 gojtvena posoda	2500	2,8 x 10 ⁶	500	od 3 do 5
T-75 gojtvena posoda	7500	8,4 x 10 ⁶	1500	od 8 do 15
6 luknjic plošča	962	1,2 x 10 ⁶	300	3
12 luknjic plošča	401	0,4 x 10 ⁶	200	2
24 luknjic plošča	200	0,2 x 10 ⁶	100	1

Gojtveno posodico smo čimprej prenesli v inkubator na 37 °C in nato smo inkubirali 5 minut. Po inkubaciji smo gojtveno posodico močno udarili po površini laminarja, da smo dodatno odlepili celice, ki so ostale pritrjene na dno plastične posodice. Odlepljanje celic od dna smo spremajali pod invertnim mikroskopom. Ko so se celice odlepile od dna in postale

okroglo, smo tripsinu dodali 2-kratni volumen ogretega gojišča s serumom, da smo preprečili nadaljnje delovanje tripsina. Z avtomatsko pipeto smo dobro premešali nastalo mešano suspenzijo in dobro sprali robove gojitvene posodice. Celice smo s pipeto prenesli v mikrocentrifugirko (v odvisnosti od površine gojitvene posodice) in jih nato centrifugirali 5 minut pri 1400 rpm, na 4 °C ohlajeno centrifugo. Po končanem centrifugiranju smo celicam odstranili supernatant in pelet resuspendirali v 1 ml ustreznega, svežega gojišča ali PBS raztopino, glede na nadaljevanje poskusa. Celice smo dobro premešali, da smo dobili celično suspenzijo posameznih celic, nato smo celice prešteli.

3.2.5 Določanje števila celic s števno komoro

Najstarejša naprava za štetje celic, ki so jo zdravniki in hematologi primarno uporabljali za štetje krvnih celic, je hemocitometer. Danes obstajajo različni tipi hemocitetrov npr. Neubauer, Thoma, Bürker Turkovaitd.

3.2.5.1 Hemocitometer

Najbolj uporabljana števna komora je Bürker Turkova steklena ploščica z dvema osrednjima kvadratoma, ki sta natančno 0,1 mm pod nivojem ravnine stranskih grebenov, prekritih s krovnim stekлом. Vsaka sredinska kvadrata imata vgravirano Neubauerjevo mrežico s standardizirano velikostjo kvadratkov (**Slika 7**). Vgravirana mreža je sestavljena iz 9 velikih kvadratov, od teh so štirje razdeljeni na 16 manjših kvadratov in 5 je razdeljenih na 25 manjših kvadratov. Vse skupaj lahko ločimo na tri različne kvadrate z različnimi dimenzijami. Pri določanju koncentracije je zelo pomembna prostornina kvadrata, v katerem bomo šteli celice. Prostornino kvadra dobimo kot produkt merskih števil dolžine (a), širine (b) in višine (c) prikazano v naslednji formuli:

$$V = a \times b \times c \quad \dots (1)$$

Krog št. 1 (**Slika 7**) ima prostornino $V = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,1 \mu\text{L}$; krog št. 2 ima prostornino $V = 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,0063 \text{ mm}^3 = 0,0000063 \text{ cm}^3 = 0,0063 \mu\text{L}$; krog št. 3 ima prostornino $V = 0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,004 \text{ mm}^3 = 0,000004 \text{ cm}^3 = 0,004 \mu\text{L}$. Vsak proizvajalec števnih komor poda svoja navodila uporabe, vendar je splošno znano, da večje celice (npr. krvne celice – eritrocite, levkocite...) štejemo v zunanjih 4 kvadratih, manjše (npr. limfocite) pa v notranji centralni mreži. Volumen vzorca, ki ga odpipetiramo v komoro, je $10 \mu\text{L}$. Število celic določimo z izračunom po naslednji formuli:

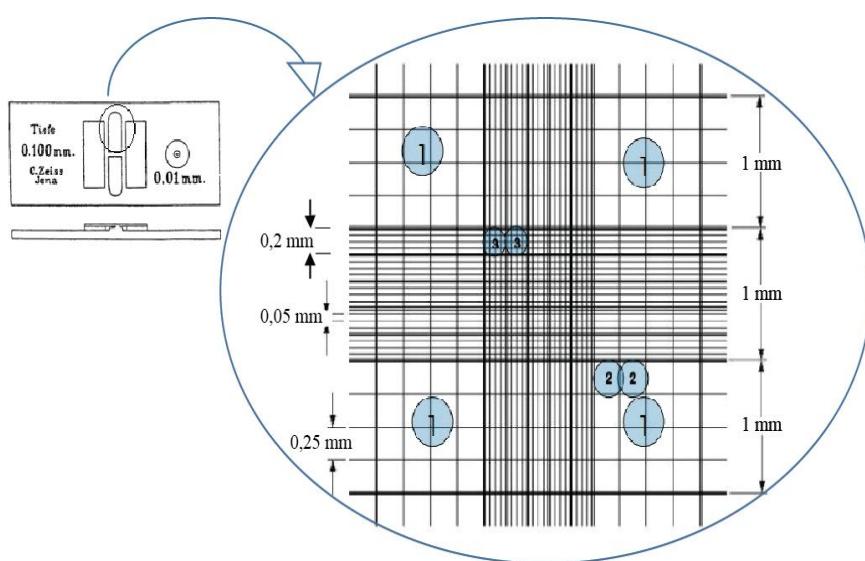
$$\text{št. } \frac{\text{celic}}{\text{ml}} = \frac{\text{prešteto število celic}}{\text{št. preštetih kvadratov}} \times \text{redčitev vzorca} \times \frac{1}{\text{prostornina kvadrata (cm}^3\text{)}} \quad \dots (2)$$

Danes obstajajo tudi avtomatizirane metode za štetje celic v suspenziji (npr. Vi-Cell avtomatska naprava za štetje celic, pretočni citometer, itd.), ki so pomembne predvsem, kadar imamo opravka z velikim številom vzorcev.

3.2.5.2 Princip neposrednega določanja števila celic z Bürker Turkovo števno komoro

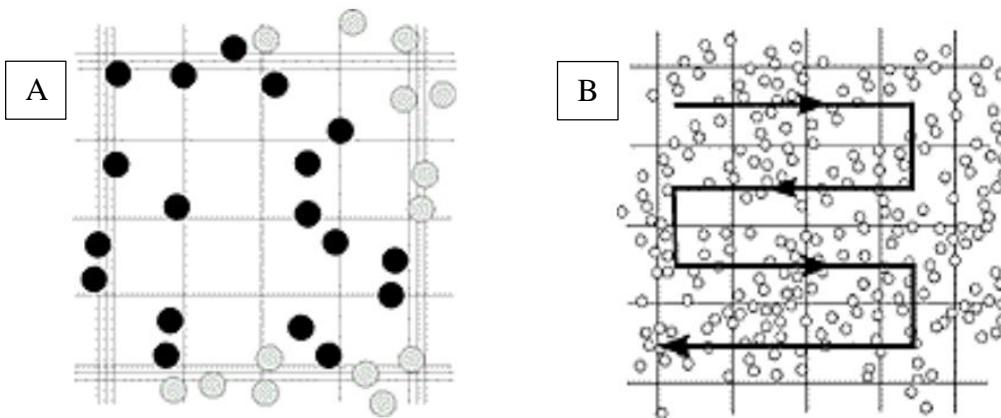
Ko smo mezenhimske matične celice odlepili iz plastike, smo želeli čim hitreje določiti skupno število celic v kulturi s štetjem celic v števni komori. Z določanjem števila celic v kulturi zagotovimo kontrolirano in enakomerno rast celičnih kultur v različnih fazah gojenja celic ali zamrzovanja ustreznega števila celic v tekočem dušiku.

Števno komoro smo očistili s 70 % etanolom in dobro očistili z brezprašno krpico. Nato smo rahlo navlažili brušene dele števne komore, nanje pritisnili krovno stekelce, da smo pokrili obe mreži. Pri tem smo pazili, da ne pritiskamo na osrednji del, ker lahko zlomimo krovno stekelce. Pri pravilno nameščenem krovnem stekelcu se pokažejo mavrični Newtonovi krogi, kar zagotavlja pravilno globino števne komore. Vzorec, kateremu smo hoteli določiti število celic v suspenziji, smo predhodno po potrebi redčili z gojiščem ali pa s tripanskim modrili v razmerju 1:1. Kadar smo uporabljali tripansko modrilo, smo vedno vzeli 100 µl barvila ter 100 µl celične suspenzije. S pomočjo avtomatske pipete smo suspenzijo premešali približno desetkrat s polovičnim volumnom. Tako pripravljeno suspenzijo smo inkubirali 5 minut na sobni temperaturi zato, da prodre tripansko modrilo v notranjost celičnih membran mrtevih celic. Mrtve celice se obarvajo modro, zato jih lahko ločimo od živih celic, ki se ne obarvajo. To nam omogoča določiti odstotek viabilnosti (živost) celic med procesom transdiferenciacije. Primerno pripravljeno suspenzijo za štetje smo prenesli v eno od komor z avtomatsko pipeto. Konico pipete prislonimo na centralno površino tik ob krovnem stekelcu tako, da kapilarni tok sam potegne vsebino v števni prostor.



Slika 7: Najbolj uporabljeni števna komora, dizajnirana s strani Karla Bürkerja, v kombinaciji z gravirano Neubaurjevo mrežo za štetje celic. Pridelano po Bastidas in sod. (2014).

Potreben volumen za pravilno napolnjeno komoro je približno 10 µl. Pri polnjenju smo pazili, da je števna komora napolnjena do robov in da se vzorec ne preliva v sosednjo komoro. Pozorni smo bili, da se komora ni posušila, ker štetje potem ni zanesljivo. Nato je sledilo delo s svetlobnim mikroskopom. Pod mikroskopom smo se najprej pod 10x povečavo orientirali po mrežici, ki smo jo lažje našli z bolj zaprto zaslonko. Šteli smo pod 10x ali 20x povečavo svetlobnega mikroskopa in upoštevali pravila štetja, kot je prikazano na **Sliki 8**.



Slika 8: Primer pravilnega štetja celic znotraj gravirane mreže. Pridelano po Bastidas in sod. (2014).

Prešteli smo celice v vseh zunanjih 4 kvadratih s površino 1 mm² ali pa sredinski kvadrat, tako da smo izbrali 5 naključnih kvadratkov označeni z številko 3 (**Slika 7**). Viabilne (žive) celice so okrogle z jasnim sijočim robom, mrtve celice izgledajo neprosojne, z nagubanim in ne sijočim robom ter so nepravilnih oblik. Če celice ležijo na robu mreže, smo prešteli samo tiste, ki z več kot polovico svoje površine segajo v notranjosti mreže kvadrata (**Slika 8-A**). Določanje koncentracije celic je natančnejše, kadar prestejemo večje število celic. Za rutinsko presajanje celic je dovolj, da je število celic v kvadratu med 100 - 300. Če smo ugotovili, da je celic premalo, smo jih ponovno centrifugirali in re-suspendirali v manjšem volumnu gojišča. Če pa je bilo celic preveč, smo jih ustrezno redčili (redčitve 1:10, 1:100) in faktor redčitve upoštevali pri izračunu koncentracije celic (**Formula 2**). Za določanje viabilnosti (živosti) je bilo potrebno prešteti posebej mrtve in žive celice. Nato smo sešteli mrtve in žive celice ter dobili skupno število celic. Viabilnost celic smo preračunali po naslednji formuli:

$$Viabilnost (\%) = \frac{\text{preštete žive celice}}{\text{skupno število celic}} \times 100 \quad \dots (3)$$

$$Mrtve celice (\%) = \frac{\text{preštete mrtve celice}}{\text{skupno število celic}} \times 100 \quad \dots (4)$$

3.2.6 Shranjevanje osamelih MMC

Po osamitvi mezenhimskih matičnih celic iz maščobnega tkiva smo jih ustreznno shranili v zamrzovalnik na -80 °C. Za dolgotrajno shranjevanje osamljenih celic je potrebno uporabiti krioprotektant (npr. DMSO), ki prepreči nastanek ledenih kristalov, saj lahko ti kristali poškodujejo celice. Volumen zamrzovalnega medija je pomemben glede na število celic, ki smo jih žeeli shraniti. Določeno število kriovial smo shranili v celični banki podjetja Animacel, ostalo, kar ni bilo predvideno za terapije, pa smo uporabljali za raziskavo ob predhodno podpisanimu soglasju lastnika.

Predhodno tripsinizirane celice, ki plavajo v suspenziji, smo centrifugirali 5 minut pri 4 °C in 1400 rpm. Določili smo število celic po postopku, opisanemu v **poglavlju 3.2.5**, ter odpipetirali ustrezen volumen celične suspenzije, ki smo ga žeeli shraniti. Nato smo ponovno centrifugirali 5 minut pri 4 °C in 1400 rpm, da smo zamenjali medij za gojenje celic z zamrzovalnim medijem. Usedlino oz. pelet, ki vsebuje približno 10^6 celic, smo resuspendirali z 1 ml zamrzovalnega medija. Zamrzovalno gojišče (**poglavlje 3.1.4**) smo vedno dodajali mrzlo, neposredno iz hladilnika, saj na ta način preprečujemo toksično delovanje DMSO na celice. Z avtomatsko pipeto smo usedlino dobro premešali, hitro prenesli v 1 ml krioviale, jih dali v ohlajeno posodo za zamrzovanje "Mr. Frosty", ki se ohlaja 1 °C/minuto ob prenosu v zamrzovalnik pri -80 °C, in pustili čez noč. Naslednji dan smo zmrznjene krioviale premestili v škatlo, kjer smo shranili osamljene mezenhimske matične celice, in pustili naprej v zamrzovalniku pri -80 °C. Za dolgotrajno shranjevanje smo osamljene celice prenesli v tekoči dušik pri -196 °C in zagotovili pogoje za varno shranjene celice, ki bodo ob potrebi za terapijo vedno na voljo tudi čez nekaj let.

3.2.7 Postopek odtajevanja shranjene celice

Zmrznjeno kriovialo s celicami smo vzeli iz tekočega dušika in jo čimprej prestavili v inkubator pri 37 °C za 5 minut. Vmes smo centrifugo ohladili na 4 °C. Odtaljeno vsebino celic iz inkubatorja smo prenesli v sterilno komoro, ki smo jo pred tem očistili z razkužilom (70 % etanol). Od tukaj naprej smo z celicami delali zelo previdno, saj je celična rast MMC zelo pomembna za nadaljnje delo. Volumen smo prenesli v sterilno 1,5 ml plastično epruveto in centrifugirali 5 minut pri 4 °C in 1400 rpm. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in usedlino celic resuspendirali v svežem rastnem gojišču Animacel. V odvisnosti od tega, kako hitro smo žeeli imeti namnožene celice s konfluentnostjo 80 %, smo se sproti odločali o volumnu rastnega medija, s katerim smo resuspendirali celični pelet. Dodali smo 1 ml svežega gojišča, zelo dobro premešali z avtomatsko pipeto ter 500 µl prenesli v 25 cm² gojitvene posodice z dodatnim 2,5 ml gojišča Animacel. Iz 1 ml resuspendiranih celic smo nasadili dve gojitveni posodici T25 cm². Najprej smo odpipetirali gojišče v gojitveno posodico in šele nato prenesli vsebino resuspendiranih celic približno na sredino gojitvene posodice. Ob prenosu celic v gojitveno posodico smo celice nežno z krožnimi gibi razporedili po površini dna plastike. Ko smo celice nasadili, smo gojitvene posodice zelo previdno prenesli v inkubator pri 37 °C in atmosferi s 5 % CO₂ zato, da smo imeli

enakomerno nasajeno kulturo mezenhimskih matičnih celic po celi površini gojitvene posode. V dveh dneh smo namnožili drugo pasažo konfluentnih mezenhimskih matičnih celic, ki so bile tako pripravljene za presajanje oz. za nadaljnji postopek transdiferenciacije.

3.2.8 Presajanje in dohranjevanje celične kulture

Rast celic smo spremajali vsak dan pod svetlobnim mikroskopom. Glede na morfologijo in konfluentnost mezenhimskih matičnih celic smo se odločali, ali nadaljujemo s transdiferenciacijo ali pa pustimo, da celice rastejo do naslednjega dne. Ko so celice v gojitvenih posodicah dosegle 80 % konfluentno stanje (približno 2 dni), smo celice ustreznou presadili v nove gojitvene posodice. Celicam smo odstranili izrabljeno gojišče, nato sprali s 3 ml D-PBS (za T-25cm² gojitveno posodico) ter nadaljevali s tripsinizacijo (**poglavje 3.2.4**). Celično suspenzijo smo dobro resuspendirali in s spiranjem plastične površine posodice poskušali poskrati čim več celic. Nato smo centrifugirali 5 minut pri 4 °C in 1400 rpm. Celični pelet smo resuspendirali z 1 ml svežega gojišča, prešteli s hemocitometrom (**poglavje 3.2.5**) in razredčili glede na želeno koncentracijo celic, ki smo jo želeli nasaditi.

V odvisnosti od vrste poskusa za karakterizacijo transdiferenciranih mezenhimskih matičnih celic smo izbrali ustrezne gojitvene posodice, v katere smo presadili celice. Ključni parameter za uspešno transdiferenciacijo MMC v živčne celice je dovolj veliko število celic v gojitveni posodici. Za spremjanje morfologije in živosti nediferenciranih in transdiferenciranih celic smo potrebovali po dve gojitveni posodici T-25 cm² in po 3 gojitvene posodice T-25 cm² za pretočno citometrijo, za vsako točko merjenja transdiferenciacije ter za vsako žival posebej. Suspenzijo celic smo dobro premešali z avtomatsko pipeto in prenesli po 500 µl celične suspenzije v vsako posodico, saj smo se odločili, da je optimalna nasaditvena gostota v T-25 cm² gojitvenih posodicah za nevrotransdiferenciacijo 100000 celic/cm².

Med optimizacijo smo uporabljali tudi posamezne okrogle gojitvene posodice z dimenzijo 35 mm x 10 mm, v katere smo nasadili približno 80000 celic/cm². Za imunobarvanje - imunocitokemijsko karakterizacijo celic smo nasadili gojitveno posodico s 24 luknjicami, v kateri smo predhodno prevlekli krovna stekelca z lamininom. Nasaditvena gostota celic je bila vedno okoli 20000 celic/cm². Volumen svežega gojišča smo dodali glede na velikost gojitvene posodice, v katerih smo nasadili celice. V gojitvene posodice T-25 cm² smo dodali 5 ml svežega gojišča, v T-75 cm² smo dodali 12 ml svežega gojišča, v okroglo gojitveno posodico 35 mm x 10 mm in posodico z 6 luknjicami po 3 ml gojišča, v posodico z 24 luknjicami pa smo dodali po 500 µL svežega gojišča.

Gojišče smo menjali dvakrat tedensko oziroma na tri do štiri dni ne glede na to, ali smo celice transdiferencirali ali namnoževali. Glede na časovnico sestavljenega eksperimenta, smo v določenih točkah uporabljali različne medije, zato smo si predhodno namešali ustrezne rastne in diferenciacijske medije ter jih hranili v hladilniku na 4 °C.

3.2.9 Transdiferenciacija MMC v živčne celice

Po 24 urah gojenja MMC v primarni kulturi, ko se je velik delež teh celic uspešno pritrtil na površino gojitvene posodice, smo zamenjali gojišče Animacel s pred-diferenciacijskim medijem (**poglavje 3.1.4**). Istočasno smo imeli tudi kontrolno celično kulturo, pri katerih smo ponovno zamenjali rastni medij. Od tukaj naprej je bil naš cilj poiskati najbolj ustrezeno gojišče, ki bo pripomoglo k transdiferenciaciji MMC v živčne celice in/ali oporne živčne celice. S tem namenom smo preizkusili različne kombinacije diferenciacijskih gojišč opisanih v predhodnih raziskavah (Anghileri in sod., 2008; Lim in sod., 2010; Wu in sod., 2001). Izbrali smo protokole za transdiferenciacijo po objavljenem članku raziskovalne skupine Park in sod., 2012 ter nekatere protokole tudi kombinirali med seboj.

V predhodnem delu raziskave, ko smo izbirali najbolj primerno gojišče, smo istočasno gojili celice z diferenciacijskim gojiščem NIMa, NIMb, NIMc in KEM v okroglih petrijevkah z dimenzijami 35 mm x 10 mm in nasaditveno gostoto 80000 celic/cm² ter v posodice z 24 luknjicami nasadili celice z gostoto 20000 celic/cm². Celično gostoto nasajenih celic smo zadržali tudi po izboru najboljšega medija za transdiferenciacijo MMC v živčne celice. Diferenciacijski medij smo menjali na tri dni in vsakodnevno spremljali rast pod invertnim mikroskopom.



Slika 9: Izbor ustreznega diferenciacijskega medija za eno žival, med izvajanjem poskusa na Univerzi v Oslu (lastna fotografija).

V času predhodnega poskusa smo izbrali pet točk spremljanja uspešnosti transdiferenciacije: nediferencirane, pre-diferenciacija, 3, 6 in 9 dni po transdiferenciaciji v ustreznem mediju. Za izbrani diferenciacijski medij smo upoštevali meritve treh tehničnih ponovitev za nediferenciacijsko točko in 3 dni transdiferenciacije ter eno tehnično ponovitev za 9 dni transdiferenciacije, zaradi pomankanja celic. Poskus smo zasnovali tako, da smo za vsako metodo ter vsako žival posebej gojili celice v ustreznih posodicah.

3.2.10 Določanje živosti in morfologije transdiferenciranih MMC celic

Uporabljali smo neposredno metodo določanja živosti v celični kulturi s pomočjo tripanskega barvila in štetja celic s pomočjo hemocitometra. Postopek določanja živosti je opisan v **poglavlju 3.2.5.1.** Pridobljene rezultate smo sprotro beležili in vpisovali v Excelovo tabelo, kjer smo potem podatke tudi statistično obdelali. Izrisali smo tudi rastne krivulje transdiferenciranih celic v treh točkah s pomočjo programa Excel 2010.

Preden smo celice odlepili s površine gojitvenih posodic, da bi jih prešteli in določili njihovo živost, smo najprej pod konfokalnim mikroskopom opazovali morfologijo celic in sproti slikali vsako transdiferencijsko točko kot tudi vse kontrole. Spremljanje rasti in morebitna odstopanja v morfologiji celic so bili prvi parametri, s katerimi smo se odločali o uspešnosti trandiferenciacije.

3.2.11 Imunobarvanje

Metoda imunobarvanje je najbolj razširjena kvalitativna metoda, ki omogoča natančno določanje lokacije ciljnega proteina. Gre za imunološko tehniko, ki temelji na principu specifične vezave protitelesa na antigen oz. tarčnega proteina, ki ga želimo lokalizirati. Za bolj natančno določanje lokacije ciljnega proteina pa uporabljam protitelesa, ki so označena s fluorokromi (npr. fluorescein izotiocianat) ali encimi, kjer se ob specifični vezavi sproži kemijska reakcija in vidimo obarvan produkt pod flurescenčnim mikroskopom. Fluorokromi se aktivirajo pri določeni valovni dolžini svetlobe in oddajajo svetlobo pri drugi valovni dolžini v vidnem delu spektra. V literaturi najdemo dva izraza, ki ponazarjata metodo imunobarvanja: 1. imunohistokemijo (ICH; angl. *Immunohistochemistry*) in 2. imunocitokemijo (ICC; angl. *Immunocytochemistry*). ICH uporablja protitelesa z namenom proučevanja označevalcev tkiv v tkivnih rezinah, medtem ko ICC uporablja protitelesa v raziskavah celic ali tkiv gojenih v kulturah.

Uporabljali smo posredno metodo imunobarvanja, ki vključuje primarna protitelesa proti pasjemu antigenu in sekundarna protitelesa proti primarnim protitelesom, na katerih je vezan flurokromom.

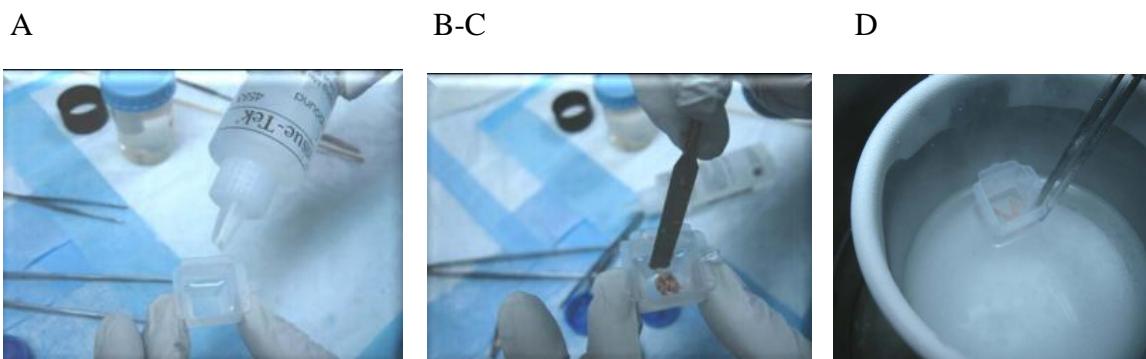
3.2.11.1 Imunohistokemija možganskih rezin

Testiranje koščkov tkiva pasjih možganov z metodo imunohistokemije predstavlja pozitivno kontrolo za naš poskus. Poleg tega smo dobili podatek o delovanju in specifičnosti posameznih protiteles, s katerim smo karakterizirali transdiferencirane MMC v živčne celice. Za izvedbo metode smo potrebovali štiri dni. Prvi dan smo pripravili možganske rezine v mediju O.C.T., nato je sledila dvodnevna izvedba metode ICH in zadnji dan slikanje pripravljenih preparatov s konfokalnim mikroskopom.

3.2.11.1.1 Priprava možganskih rezin

V dveh urah po prevzemu pasjih možganov iz veterinarske klinike (Univerza v Oslu) smo začeli s pripravo zamrzovanja svežih možganov v obliki blokov, ki smo jih kasneje rezali na kriostat napravi. Najprej smo možgane razrezali na majhne koščke 20 mm x 20 mm in nato inkubirali 4 ure v fiksacijski raztopini na 4 °C, ki vsebuje 4 % paraformaldehid. Po inkubaciji smo koščke tkiva dvakrat spirali s PBS in nato prenesli v 30 % saharozo, 4° C in inkubirali čez noč. To je zelo pomemben korak zato, ker preprečuje nasičenje proteinov in omogoča daljše časovno shranjevanje proteinov. Naslednji dan smo koščke tkiva prestavili v PBS in dvakrat spirali v majhni plastični kadički. Prinesli smo tekoči dušik, medij O.C.T in plastične modelčke za oblikovanje blokov, v katerih smo shranili koščke tkiva.

- A. Plastičen modelček smo najprej obložili z plastično folijo ter nato prelili medij O.C.T. do polovice.
- B. Košček fiksiranega tkiva smo postavili s pomočjo pincete čim bolj na sredino plastičnega modelčka.
- C. Do vrha posodice smo prelili z medijem O.C.T. Pazili smo na mehurčke, ki lahko povzročajo neravno površino pri rezanju na kriostatu, posledično tudi nespecifično vezavo protiteles na ciljni protein.

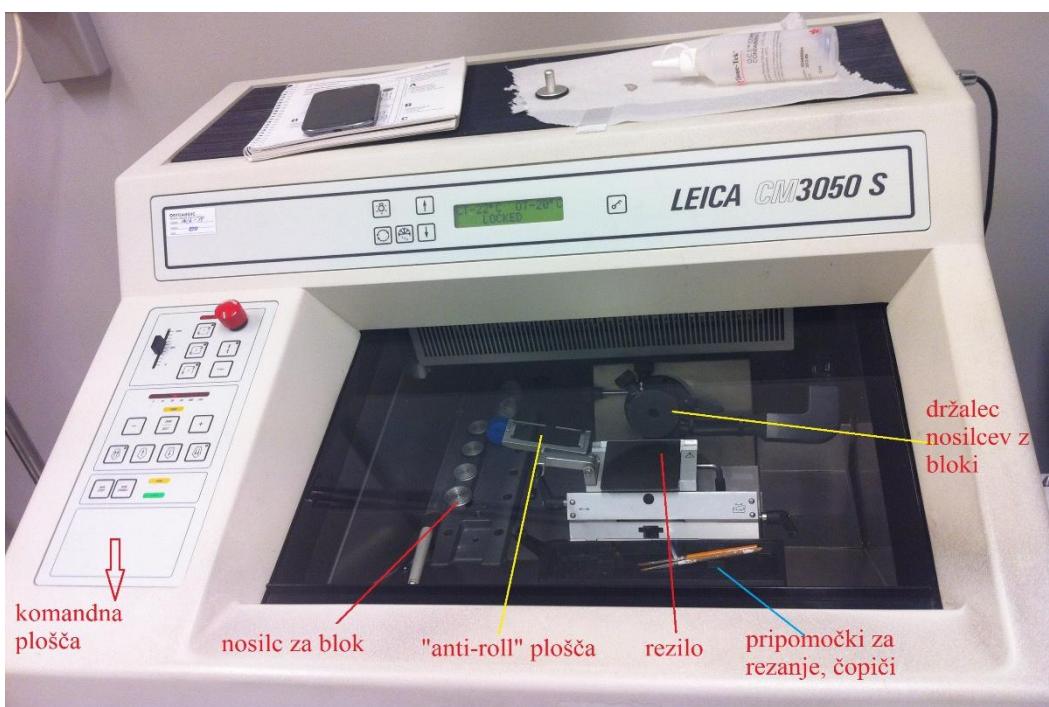


Slika 10: Priprava blokov, v katerih smo shranili košček možganskega tkiva psa. Povzeto po MHPL Cryostat sectioning Techniques (S. R. Shi in sod., 2008). Oznake črk od A do D so obrazložene v zgornjem tekstu nad/pod sliko.

- D. Tako pripravljeno posodico smo previdno prenesli do posode s tekočim dušikom ter plastični modelček spustili vodoravno v tekoči dušik za 3 sekunde. Dobili smo zaledenel blok, v katerih se nahaja košček tkiva pasjih možganov.
- E. Tako pripravljen blok smo ustrezno odstranili iz plastičnega modelčka, zavili v folijo in shranili na -20 °C.

Naslednji dan smo nadaljevali s pripravo možganskih rezin na kriostatu. Temperatura v prostoru je bila 10 °C, sam kriostat je bil ohlajen na temperaturo -20 °C. Na tak način preprečimo taljenje medija O.C.T in omogočimo pravilno rezanje tankih rezih (14 µm). Zmrznjen blok, v katerim smo prejšnji dan zamrznili koščke fiksiranih možganov, postavimo

na okrogel nosilec, dodamo medij O.C.T, da se blok lahko utrdi na površini nosilca. Počakali smo 10 minut, da se je medij O.C.T dobro strdil in ga postavili na ustrezeno pozicijo v kriostatu (Slika 8). Ko smo pripravili ustrezen naklon držalca bloka in velikost rezanja, z ohlajenim čopičem obrišemo rezilo in "anti-roll" ploščo. Rezanje je potekalo na tak način, da se je ustvarjena rezina zalepila na "anti-roll" ploščo, ki smo jo potem prenesli na objektna stekelca. V tem primeru se medij O.T.C raztopi, ker objektno steklo ni ohlajeno in možganska rezina ostane zaledljena na površini. Na enem objektnem stekelcu smo pripravili 3 skupine (bela možganska masa, siva možganska masa in mali možgani), po 6 rezin z namenom, da bi lahko zaznali živčne celice in njihove oporne celice. Tako pripravljene rezine smo shranili na 4 °C čez noč. Naslednji dan smo nadaljevali z imunobarvanjem.



Slika 11: Sestavni deli kriostata iz Univerze v Oslo, s katerim smo pripravili rezine in jih nato testirali z metodo imunohistokemije (lastna fotografija).

3.2.11.1.2 Prvi dan imunohistokemije

Pripravljena krovna stekelca smo temperirali na sobni temperaturi ter s papirnato brisačko popivnali kapljice kondenzata, ki so nastale na površini. S pomočjo hidrofobnega pisala smo obkrožili pripravljene rezine z namenom, da porabimo čim manj protiteles. Uporabili smo ustrezne redčitve za vsako uporabljen protitelo, ki smo jih pripravili v raztopini za blokiranje nespecifičnih epitopov (angl. blocking solution). Na dan poskusa uporabimo ohljen PBS, TBST ter 0,3 M glicin.

- a. V posebno plastično kadičko, namenjeno za postavitev objektnega stekelca smo prelili 0,3 M glicina in previdno delali z objektnimi stekli, na katera smo pritrdili možganske rezine. Inkubiramo 30 minut na sobni temperaturi.
- b. Blokirali smo nespecifične epitope, 30 minut na sobni temperaturi (2 % FBS, 0,1 % Triton, 1 % mleko v prahu, 0,02 % Na-azide in TBST (Tween20 + PBS)).
- c. Objektna stekla smo popivnali s papirnato brisačko in postavili horizontalno v temno škatlo. Za vsako protitelo smo imeli dve objektni stekelci. Previdno smo prekrili rezine s pripravljenimi primarnimi protitelesi in jih inkubirali čez noč na 4 °C v temi.

Preglednica 9: Uporabljena protiteesa in ustrezne redčitve za imunohistokemijo

gostitelj	protitelo	redčitev	sekundarno protitelo	redčitev	negativna kontrola
Miš	NF-pan	1:5000	Kozje protitelo proti mišjemu IgG – Cy3	1:500	raztopina za blokiranje nespecifičnih epitopov + sekundarno protitelo
	BIII tubulin	1:400			
Kokoš	Nestin	1:200	Kozje protitelo proti kokošjemu IgG – Alexa 647	1:500	
Kunec	GFAP	1:500	Kozje protitelo proti kunčjemu IgG – Alexa 488	1:500	
	MAP2	1:400			

3.2.11.1.3 Drugi dan imunohistokemije

Po inkubaciji čez noč z primarnimi protiteles smo nadaljevali:

- a. Spirali 5 x 5 minut PBS
- b. Spirali 1 x 5 minut TBST
- c. Objektna stekelca smo postavili horizontalno in čez rezine nanesli ustrezen volumen sekundarnih protiteles. Inkubirali 2 uri na sobni temperaturi v temi.
- d. Spirali 5 x 5 minut PBS
- e. Inkubirali smo 1 do 2 minuti na sobni temperaturi z barvilo Hoechst (1:1000). Delali smo v posebnem prostoru in smo bili ustrezeno zaščiteni z masko in rokavicami, ker je barvilo rakotvorno.
- f. Spirali 2 x 5 minut v PBS. Uporabljeno raztopino smo zlili v poseben zabojsnik samo za Hoechst barvilo.
- g. Pripravili smo krovna stekelca (velikost 24 mm x 16 mm), tako da smo jih sprali z 70 % etanolom in pustili, da se posušijo na papirnatih brisačkah.
- h. Nad rezine smo kapljali predhodno pripravljeno mešanico glicerola: PBS v razmerju 1:1, prekrili s krovnim stekelcem in nato vse skupaj ob robovih zatesnili z brezbarvnim lakom za nohte.
- i. Tako pripravljen mikroskopski preparat smo shranili na -20 °C do slikanja na konfokalnem mikroskopu.

3.2.11.2 Karakterizacija transdiferenciranih MMC z metodo imunocitokemije

Imunocitokemija je najbolj pogosto uporabljena metoda v celični biologiji, ki s pomočjo protiteles zaznava izražanje proteinov na površini ali znotraj celice. V gojitveni plošči z 24 luknjicami smo najprej okrogle krovna stekelca prevlekli z lamininom, nato nasadili MMC celice z gostoto 20000 celic/cm² in gojili 24 ur do 80 % konfluence v rastnem gojišču Animacel. V predhodnem delu poskusa smo testirali 5 gojišč za eno žival ter za vsako gojišče imeli tri časovne točke spremljanja transdiferenciacije: pred-diferencijska točka, 3 dni, 6 dni in 9 dni. Testirali smo tudi več protiteles z namenom, da bi izbrali najbolj specifična protitelesa za karakterizacijo transdiferenciranih celic (NF-pan, NF-H, GFAP, nestin, NSE, βIII-tubulin, MAP2, Pax6). Za poskus pa smo imeli 6 živali, eno izbrano diferenciacijsko gojišče ter tri izbrana protitelesa (GFAB, MAP2 in NF-H). Za vsako transdiferencijsko točko smo imeli posebno nasajene celice v ločenih posodicah z 24 luknjicami.

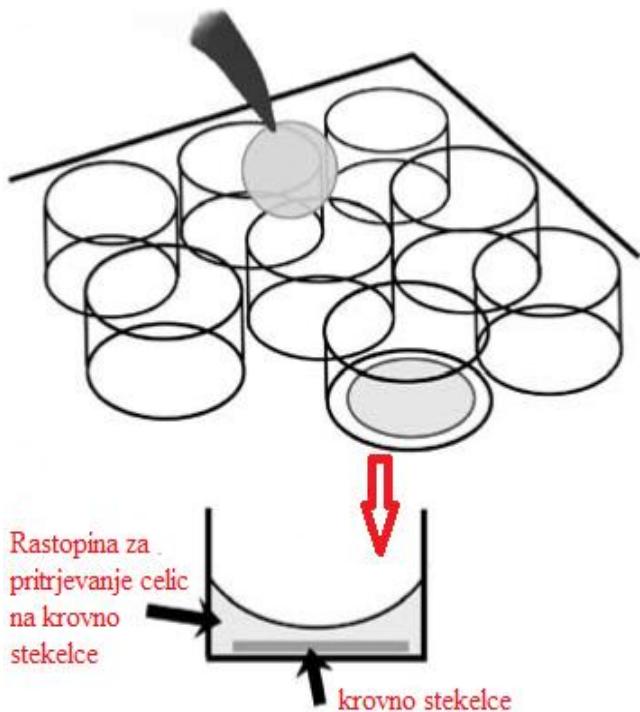
Preglednica 10: Uporabljeni protitelesi za določanje uspešnosti transdiferenciacije

gostitelj	protitelo	redčitev	sekundarno protitelo	redčitev	negativna kontrola		
Miš	NF-pan	1:5000	Kozje protitelo proti mišjemu IgG – Cy3	1:500	raztopina za prekrivanje nespecifičnih epitopov + sekundarno protitelo		
	Pax 6	1:1					
	β III tubulin	1:400					
Kokoš	Nestin	1:200	Kozje protitelo proti kokošjemu IgG – Alexa 647	1:500			
Kunec	MAP2	1:200	Oslovo protitelo proti kunčemu IgG – Cy2	1:500	Neoznačene celice		
	NF-H	1:400					
	Pax 6	1:100	Kozje protitelo proti kunčemu IgG – Alexa 489				
	β III tubulin	1:400					
	GFAP	1:500					
	mAb GFAP - Alexa Fluor 488	1:400	/				

3.2.11.2.1 Laminin prevleka za krovna stekelca

Za proučevanje tarčnih proteinov v celicah, ki se izražajo po transdiferenciaciji, smo se odločili za kvalitativno metodo imunobarvanja. Mezenhimske matične celice se pritrjujejo na površini plastike, vendar ne tako močno, da bi jih lahko dodatno spirali in kemijsko obdelovali, kot to zahteva metoda imunobarvanja. Odločili smo se, da je najboljša rešitev nasaditev MMC na okrogla krovna stekelca, ki so predhodno prevlečena z Lamininom.

Laminin je sestavni del ekstracelularnega matriksa, ki se najpogosteje uporablja za pritrjevanje živčnih celic v kulturi, kožnih celic, levkocitov, CHO celic na plastični površini za metodo imunobarvanja. Pripravili smo založno raztopino laminina v PBS raztopini s koncentracijo 1 mg/ml, sterilno filtrirali in zamrznili alikvote na -20 °C. Okrogla krovna stekelca smo najprej sterilizirali in jih nato s pomočjo pincete prenašali v ploščo s 24 luknjicami (**Slika 12**).



Slika 12: Priprava površine krovnih stekelc v posodico z 24 luknjicami

Ves čas smo delali v laminarju, saj je zagotavljanje sterilnih pogojev v gojitvenih posodicah, kjer bodo rastle celice, bistveno za nadaljnje delo. Alikvot laminina smo raztopili in še dodatno redčili do končne koncentracije 10 µg/ml s PBS raztopino. S pomočjo seroloških pipet smo prekrili sterilna krovna stekelca in inkubirali 4 ure na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo odpipetirali laminin in spirali dvakrat s PBS. Tako prevlečena krovna stekelca so pripravljena za nasaditev celic. Pazili smo, da se prevleka ne posuši, kajti na ta

način lahko pride do razpok, ki motijo rast celic. Če nismo še isti dan nasadili celic, smo prevlečena stekelca z lamininom prekrili s PBS in jih shranili v hladilniku na 4 °C.

3.2.11.2.2 Prvi dan imunocitokemije

- a. Odstranili smo ves medij ter celice sprali z 1 ml PBS
- b. Fiksacija celic v 4 % paraformaldehid, 10 minut na sobni temperaturi
- c. Spiranje celic 1 x 5 minut z 2 ml PBS. Med spiranjem smo inkubirali na stresalniku pri najmanjših obratih
- d. Sledila je permeabilizacija celične membrane; 1 x 5 minut v 2 ml TBST
- e. Blokiranje nespecifičnih epitopov s pripravljeno raztopino (10 % FBS, 1 % mleko v prahu, 0,02 % Na-azid, TBST in pH 7,2) na sobni temperaturi za 1 uro.
- f. Spiranje 1 x 5 minut z 2 % FBS v PBS
- g. Na parafilmski papir smo narisali shemo razvrstiteve posameznih protiteles in jih prestavili v trdno škatlo s pokrovom. Pipetirali smo 100 µL na parafilmsko shemo že pripravljena protitelesa. Nato smo s pinceto previdno položili krovna stekelca s celicami obrnjena na kapljico ustreznega protitelesa. Inkubirali smo čez noč na 4 °C v temi.

3.2.11.2.3 Drugi dan imunocitokemije

- a. Spiranje 3 x 2 minut z 4 ml PBS
- b. Spiranje 1 x 5 minut z 2 % FBS v PBS
- c. Inkubacija s sekundarnimi protitelesi, ki poteka 2 uri na sobni temperaturi v temi. Postopek izvedbe je identičen kot pri pripravi primarnih protiteles opisan pod točko g. Za negativno kontrolo namesto protiteles uporabimo raztopino za blokiranje nespecifičnih epitopov.
- d. Po inkubaciji ponovno s pinceto prenašamo v posodico s 24 luknjicami, vendar smo previdni, da pinceto sprotročno čistimo z 70 % etanolom in destilirano vodo zaradi prenosa drugih protiteles na površino celic.
- e. Na hitro spiranje 2 x s 4 ml PBS
- f. Spiranje 1 x 5 minut s 3 ml PBS
- g. 1 x 5 min inkubacija z barvilom DAPI
- h. Spiranje 2 x 5 minut s 3 ml PBS
- i. Na objektno stekelce smo s pipeto prenesli nekaj kapljic 50 % glicerola. Nato okrogla stekelca prenesemo tako, da so celice obrnjene navzdol. Počakali smo nekaj minut ter nato odvečne kapljice pobrisali s papirnato brisačko. Za preprečitev izhlapevanja tekočine smo prostor med objektnim in krovnim steklom zatesnili s prozornim lakom za nohte. V primeru, da nismo nadaljevali s snemanjem pripravljenih preparatov, smo jih zamrznili na -20 °C.
- j. Preparate smo opazovali s konfokalno mikroskopijo in posnete slike ustrezno shranili.

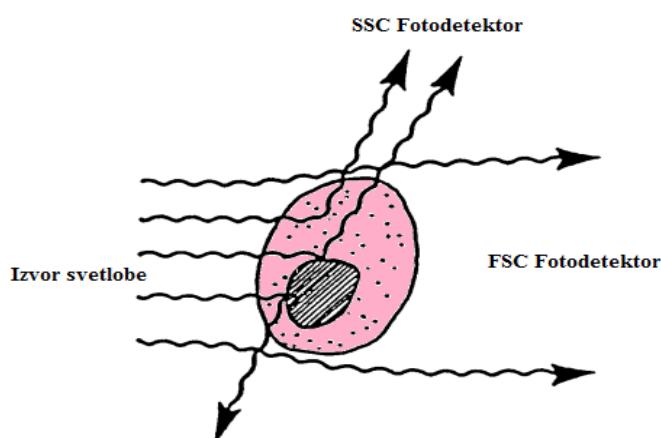
3.2.12 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija (angl. *Flow Cytometry*) je metoda, ki omogoča štetje in analizo posameznih celic. Poleg tega zajema različna področja uporabnosti, od molekularne biologije do kmetijstva.

Prvi koncept pretočne citometrije je opisal in raziskoval Wallace Coulter v 40. letih dvajsetega stoletja. Njegova naprava za štetje celic je bila zasnovana na Ohmovem zakonu fizike ($\delta U = I \times \delta R$), da je upornost celic drugačna od upornosti prevodne tekočine, ki jih obdaja. Konstruirana je bila tenka kapilarna cev, skozi katero je naenkrat potovala le ena celica. Merilnik napetosti je pri konstantem toku zaznal spremembo vsakič, ko je mimo potovala celica. Iz velikosti spremembe napetosti je lahko sklepal tudi na velikost celice (Bakke, 2001). Moderni pretočni citometer so ga razvili v 60. letih dvajsetega stoletja, ko je leta 1965 Mack Fulwyler prvi konstruiral citometer, ki ima sposobnost fizično ločevati celice po opravljenih meritvah (Fulwyler, 1965). Nato je Wolfgang Gohde leta 1968 patentiral prvi pretočni citometer, ki temelji na merjenju fluorescence.

Pretočna citometrija je metoda s hitrim in občutljivim načinom merjenja fizikalnih in biokemijskih lastnosti posameznih celic, ki v suspenziji potujejo eno za drugo skozi ozek snop laserske svetlobe (Ormerod, 1993).

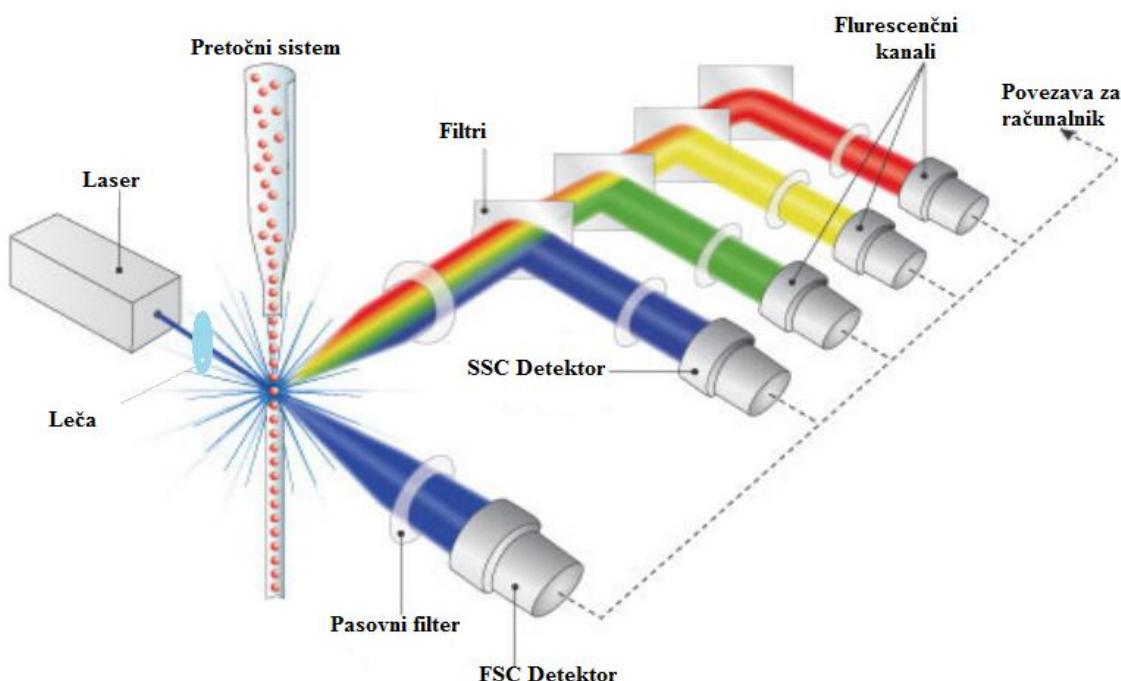
Celice so označene s fluorokromi, ki ob osvetlitvi z lasersko svetlogo oddajajo specifično svetlogo večjih valovnih dolžin. To oddano svetlogo zaznata dva fotodetektorja, ki merita sipanje laserske svetlobe na posamezni celici, v smeri neposredno na laserski žarek (angl. *FSC – Forward Scatter Channel*) in vstran od laserskega žarka (angl. *SSC – Side Scatter Channel*). Tako lahko pridobimo informacije o velikosti celic glede na svetlogo, ki jo sipa v smeri od laserskega žarka pod kotom od 0° do 20° na FSC fotodetektor. Informacije o zrnatosti celic dobimo s SSC fotodetektorjem, ki zaznava razpršeno svetlogo pravokotno od smeri laserskega žarka. Nekateri citometri lahko po merjenju tudi fizično ločijo želene celice iz heterogene raztopine celic (Givan, 2011).



Slika 13: Način lomljenja izvirne svetlobe glede na količino sprejete oz. sipane svetlobe na SSC ali FSC fotodetektorju

Nedvomno je metoda v osnovi enaka metodi flurescenčne mikroskopije, razlikuje se le v hitrosti obdelanih podatkov, avtomatiziranosti in objektivnosti (Ihan, 1999). Pomembni sestavnici deli pretočnega citometra so:

- a. vir svetlobe (laser), ki je lahko argonski, kriptonski ali kombiniran (helij-kadmijski ali helij-neonski);
- b. pretočni sistem, ki ga sestavlja pretočna komora, skozi katero tečejo celice v izotonični tekočini;
- c. optični elementi (leča, filtri, detektorji, flurescenčni kanali);
- d. elektronski elementi, ki spreminjajo svetlobne impulze v električne in nato električne v digitalne;
- e. računalniški sistem, ki zbirajo pridobljene podatke, analizira in usklajuje.



Slika 14: Sestavnici deli pretočnega citometra (prirejeno po flow cytometry tutorials, Invitrogen, 23.8.2016, <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>).

Poleg morfoloških karakteristik lahko s pretočnim citometrom analiziramo funkcionalne lastnosti celic. Pretočni citometer ima več fluorescenčnih detektorjev (PMT), ki merijo svetlobo večjih valovnih dolžin od vzbujevalne (laserske) svetlobe. Vsak detektor prejema emitirano fluorescenčno svetlobo določene valovne dolžine in na ta način meri signal, ki ga oddaja določeno fluorescenčno barvilo. Fotodetektorji pretvorijo svetlobne signale v električne. Izmerjene vrednosti električnih signalov po računalniški obdelavi prikažemo matematično in grafično. O vsaki celiči na ta način poleg podatkov o njeni relativni velikosti in zrnatosti (FSC in SSC) dobimo še informacijo o vrsti in jakosti oddanih fluorescenčnih

signalov. Razvrščanje celic glede na velikost in zrnatost omogoči razločitev MMC od celičnega drobirja, če pa želimo določiti njihovo stopnjo diferenciacije, jih je potrebno razvrstiti glede na prisotnost posameznih označevalskih molekul, katerih navzočnost ugotavljamo s specifičnimi protitelesi. Prisotnost specifičnih antigenov na površini celic ali v njihovi notranjosti lahko določimo z imunofluorescenčno tehniko, pri kateri uporabljamo za želeni antigen specifična protitelesa, ki so konjugirana s fluorokromi. (Ihan in Kopitar, 2010).

3.2.13 Potek analize s pretočno citometrijo

Pretočna citometrija je kvantitativna metoda, ki preko opazovanja optičnih lastnosti omogoča analizo in sortiranje celic. Na tak način lahko v zelo kratkem času analiziramo do 10^4 celic/sek, ki nam podajajo informacije o velikosti in granuliranosti testiranih populacij. S pomočjo pretočne citometrije smo preverili učinkovitost transdiferenciacije v treh točkah (nediferencirane, 3 dni in 9 dni). Uporabili smo pretočni citometer (BD FACSCantoTM) na Oddelku za imunologijo in mikrobiologijo (IMI) na Medicinski Fakulteti, Univerze v Ljubljani.

3.2.13.1 Vezava monoklonskega protitelesa GFAP na barvilo AlexaFlour 488

Monoklonsko kunčje protitelo razreda IgG1, proti kisli fibrilarni beljakovini – GFAP (angl. Monoclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein) smo vezali s fluorescenčnim barvilmom Alexa Fluor 488 (angl. Alexa Fluor® 488 Protein Labeling Kit (Cat. no. A10235)), ki absorbira pri 494 nm in fluorescira pri 519 nm valovni dolžini. Proizvajalec uporabljenega barvila opisuje, da je barvilo Alexa Flour po spekter valovanju identično kot fluorescein-izocijanat barvilo znano po kratici FITC, vendar po drugi strani stabilnejše na svetlobi in oddaja svetlejši signal.



Slika 15: Sestavni deli kromatografskega načina vezave protiteles z barvilmom Alexa Flour (lastne fotografije).

Protokol priprave po navodilih proizvajalca:

- a. Pripravili smo 1 M natrijev bikarbonat z de-ionizirano vodo, tako da smo vzeli komponento B iz škatle in dodali 1 ml de-ionizirane vode.
- b. Pripravili smo začetno koncentracijo protiteles 1 mg/ml ter nato dodali 100 µL, 1 M natrijevega bikarbonata.
- c. Dodali smo 100 µL pripravljenega protitelesa iz koraka b. v vijalo z barvilom Alexa Fluor 488. Vse skupaj smo premešali in inkubirali 1 uro na sobni temperaturi v temi.
- d. Vmesni čas smo izkoristili za pripravo kolone, skozi katero smo očistili vezano protitelo z barvilm iz ostalih komponent. Napolnili smo majhno plastično kolono z 1,5 ml kromatografskim polnilom (komponenta C), ki vsebuje posebno gelsko polnilo (angl. *exclusion resin*), PBS, 2 mM natrijev azid in pH 7,2. Na dnu širokega dela kolone se nahaja okrogel spužvast del, ki omogoča počasen odtok protiteles v kolono. Tako pripravljeno kolono centrifugiramo na 1100 g za 3 minute. Kolono pustimo na sobni temperaturi, dokler se tekočina ne strdi in nastane gosta mreža (**Slika 15**).
- e. Pripravljeno mešanico iz točke c. prelijemo v pripravljeno kolono in vse skupaj centrifugiramo na 1100 g za 5 minut. V spodnjem delu kolone se nahaja ventilček, ki ga po centrifugiranju odpremo in označena protitelesa poberemo v 1,5 ml mikrocentrifugirki.

3.2.13.2 Titracijska krivulja protitelesa GFAP

Z namenom, da bi ugotovili najbolj optimalno redčitev, pri kateri se monoklonsko protitelo, vezano z barvilm Alexa Fluor 488, veže na GFAP v transdiferenciranih celicah, smo naredili titracijski poskus pri štirih različnih redčitvah in jih nato analizirali na pretočnem citometru. Koncentracija pripravljenega protitelesa v 50 µl, 1 M natrijevega bikarbonata je 2,4 mg/µl, kot jo predpisuje proizvajalec. To pomeni, da je 10 µl vezanega protitelesa v mešanici primerljiva z 2 µl neredčenega protitelesa proti GFAP. Prva točka 10 µl vezano Ab+ 100 µL celične suspenzije (redčitveni faktor ~1:800); 20 µl vezano Ab+ 100 µL celične suspenzije (redčitveni faktor ~1:400); 30 µl vezano Ab+ 100 µL celične suspenzije (redčitveni faktor ~1:200) in 40 µl vezano Ab+ 100 µL celične suspenzije (redčitveni faktor 1:100).

Uporabili smo že ustaljen protokol, ki ga uporabljam na oddelku IMI za ločevanje populacij limfocitov T in njihovih znotrajceličnih označevalcev (BD Pharmingen™ Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit (kat. 560751)). Mezenhimske matične celice so populacijsko podobne limfocitom, zato smo se odločili, da bo set primerljiv tudi za označevanje transdiferenciranih celic pri merjenju s pretočnim citometrom.

Postopek priprave celic za merjenje na pretočnem citometru:

- a. 100 µL celične suspenzije s koncentracijo 1×10^6 celic/ml smo prenesli v 5 steklenih epruvet, namenjenih merjenju na pretočnem citometru.
- b. Dodali smo 2 ml lizacijske raztopine v vsako epruveto posebej.

- c. Mešali smo 3 sekunde na vibracijskemu mešalniku in inkubirali 10 minut v temi.
- d. Centrifugirali smo 5 minut pri 1600 rpm pri sobni temperaturi.
- e. Celice smo spirali z 2 ml, 2 % FBS pufra.
- f. Supernatant smo odlili in celični pelet mešali 2 sekundi na vibracijskemu mešalniku. Mešanje je zelo pomemben korak, kajti s tem preprečimo nastajanje agregatov. K peletu smo dodali 1 ml hladnega "BD Cytofix" pufra in nato na hitro premešali na vibracijskemu mešalniku. Inkubirali smo 15 minut v temi pri sobni temperaturi.
- g. Centrifugirali smo 5 minut pri 1600 rpm pri sobni temperaturi.
- h. Celice smo dvakrat spirali z 1 ml 2 % FBS pufra.
- i. Po zadnjem spiranju smo odlili supernatant in dodali 1 ml "BD Perm/Wash" pufer, ki smo ga predhodno redčili z ionizirano vodo v razmerju 1:1, ter nato inkubirali 15 minut v temi pri sobni temperaturi.
- j. Centrifugirali smo 5 minut pri 1600 rpm pri sobni temperaturi ter odstranili supernatant.
- k. Fiksiranim in permeabiliziranim celicam smo dodali mešanico protiteles tako, da smo v prvi epruveti dodali 2 µl (GFAP 1:200), drugi epruveti 4 µl (GFAP 1:400), tretji epruveti 8 µl (GFAP 1:800) in četrти epruveti 10 µl (GFAP 1:1000). V kontrolno epruveto smo dodali 5 µl, 2 % FBS. Inkubirali smo 30 minut v temi pri sobni temperaturi.
- l. Nato smo celice dvakrat sprali z 1 ml "1x BD Perm/Wash" in po drugem spiranju dodali 500 µl 2 % FBS pufra. Tako smo celice pripravili za merjenje s pretočnim citometrom.

3.2.13.3 Karakterizacija transdiferenciranih MMC s pretočno citometrijo

S pretočno citometrijo smo karakterizirali celice, ki so bile izpostavljene procesu transdiferenciacije in merili uspešnost pri treh točkah: ne-diferenciranje, 3 dni in 9 dni transdiferencirane celice. Za vsako točko smo pomerili po 30 epruvet, dvakrat na pretočnemu citometru in iz teh rezultatov izračunali geometrijsko sredino.

Celično suspenzijo smo pripravili na Veterinarski fakulteti v sklopu podjetja Animacel d.o.o ter nato transportirali na Medicinsko fakulteto, kjer so potekale meritve na pretočnem citometru.

Postopek fiksacije, permeabilizacije in inkubacije s protitelesi:

- a. 100 µl celične suspenzije z koncentracijo 1×10^6 celic/ml smo prenesli v 5 ml polistirenske epruvete (12 x 75 mm).
- b. Centrifugirali smo 5 minut pri 1600 rpm pri sobni temperaturi.

- c. Supernatant smo odstranili in dodali 1 ml 4 % paraformaldehid. Mešanico smo mešali 3 sekunde na vibracijskemu mešalniku ter nato inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi, v temi.
- d. Centrifugirali smo 5 minut pri 1600 rpm pri sobni temperaturi.
- e. Celice smo dvakrat spirali z 2 ml 2 % FBS pufra.
- f. Po zadnjem spiranju smo odlili supernatant in raztopino za blokiranje nespecifičnih epitopov, mešali 3 sekunde na vibracijskemu mešalniku in inkubirali 10 minut v temi pri sobni temperaturi.
- g. Celice smo dvakrat spirali z 2 ml 2 % FBS pufra.
- h. Centrifugirali smo 5 minut pri 1600 rpm pri sobni temperaturi ter odstranili supernatant.
- i. Fiksiranim in permeabiliziranim celicam smo dodali mešanico protiteles, tako kot je opisano v **Preglednici 9**. Inkubirali smo 30 minut v temi pri sobni temperaturi.
- j. Nato smo celice dvakrat sprali z 1 ml 2 % FBS pufra.
- k. Centrifugirali smo 5 minut pri 1600 rpm pri sobni temperaturi ter odstranili supernatant.
- l. K peletu smo dodali še ustrezno sekundarno protitelo v epruvetah s primarnimi protitelesi za MAP2 in NF-H. V epruveto za GFAP smo dodali 100 µL raztopine za blokiranje. Inkubirali smo 30 minut v temi pri sobni temperaturi.
- m. Nato smo celice dvakrat sprali z 1 ml 2 % FBS pufra in po drugem spiranju dodali 500 µL 2 % FBS pufra. Tako smo celice pripravili za merjenje s pretočnim citometrom.

Preglednica 11: Prikaz dizajniranega poskusa za karakterizacijo transdiferenciranih celic pri eni točki s pomočjo pretočnega citometra.

Ime in spol živali	GFAP	MAP2	NF-H	neg. kontrola protiteles	neg. kontrola
AT0615 (M)	100 µL celične suspenzije 120 µL GFAP - alexa fluor 488 (1:400)	100 µL celične suspenzije 3 µL MAP2 (1:200) + Cy2 sek. Ab (1:500)	100 µL celične suspenzije 1,5 µL NF-H (1:400) + Cy2 sek. Ab (1:500)	100 µL celične suspenzije Cy2 sek. Ab (1:500)	nediferencirane celice ATO 615
AT0515 (M)	100 µL celične suspenzije 120 µL GFAP - alexa fluor 488 (1:400)	100 µL celične suspenzije 3 µL MAP2 (1:200) + Cy2 sek. Ab (1:500)	100 µL celične suspenzije 1,5 µL NF-H (1:400) + Cy2 sek. Ab (1:500)	100 µL celične suspenzije Cy2 sek. Ab (1:500)	nediferencirane celice ATO 515

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 11

Ime in spol živali	GFAP	MAP2	NF-H	neg. kontrola protiteles	neg. kontrola
CRO115 (M)	100 µL celične suspenzije 120 µL GFAP - alexa fluor 488 (1:400)	100 µL celične suspenzije 3 µL MAP2 (1:200) + Cy2 sek.Ab (1:500)	100 µL celične suspenzije 1,5 µL NF-H (1:400) + Cy2 sek.Ab (1:500)	100 µL celične suspenzije Cy2 sek.Ab (1:500)	nediferencirane celice CRO 115
CRO315 (Ž)	100 µL celične suspenzije 120 µL GFAP - alexa fluor 488 (1:400)	100 µL celične suspenzije 3 µL MAP2 (1:200) + Cy2 sek.Ab (1:500)	100 µL celične suspenzije 1,5 µL NF-H (1:400) + Cy2 sek.Ab (1:500)	100 µL celične suspenzije Cy2 sek.Ab (1:500)	nediferencirane celice CRO 315
SLO115 (Ž)	100 µL celične suspenzije 120 µL GFAP - alexa fluor 488 (1:400)	100 µL celične suspenzije 3 µL MAP2 (1:200) + Cy2 sek.Ab (1:500)	100 µL celične suspenzije 1,5 µL NF-H (1:400) + Cy2 sek.Ab (1:500)	100 µL celične suspenzije Cy2 sek.Ab (1:500)	nediferencirane celice SLO 115
AT0215 (Ž)	100 µL celične suspenzije 120 µL GFAP - alexa fluor 488 (1:400)	100 µL celične suspenzije 3 µL MAP2 (1:200) + Cy2 sek.Ab (1:500)	100 µL celične suspenzije 1,5 µL NF-H (1:400) + Cy2 sek.Ab (1:500)	100 µL celične suspenzije Cy2 sek.Ab (1:500)	nediferencirane celice ATO 215

Uporabili smo argonski laser z valovno dolžino 488 nm za vse uporabljeni fluorokrome. Za obdelavo rezultatov smo uporabili program FACSDiva Verzija 6.1.2.

3.2.14 Svetlobna mikroskopija

Za spremjanje rasti celic nasajenih v gojilnih posodicah smo uporabili invertni mikroskop Nikon eclipse TS 100; Objektiv Nikon BWD 0,3/OD75. Mikroskop smo najprej očistili s 70 % etanolom in nato prestavili gojilno posodico iz inkubatorja na objektiv mikroskopa. Slike smo posneli s kamero Nikon DS-F12 pri 10x, 20x in 40x povečavi. Za obdelavo posnetih slik smo uporabili program ImageJ verzija 2. Originalne posnetke slik (brez obdelave) smo uporabili le za slike pri predhodnem delu poskusa.

3.2.15 Fluorescenčna in konfokalna mikroskopija

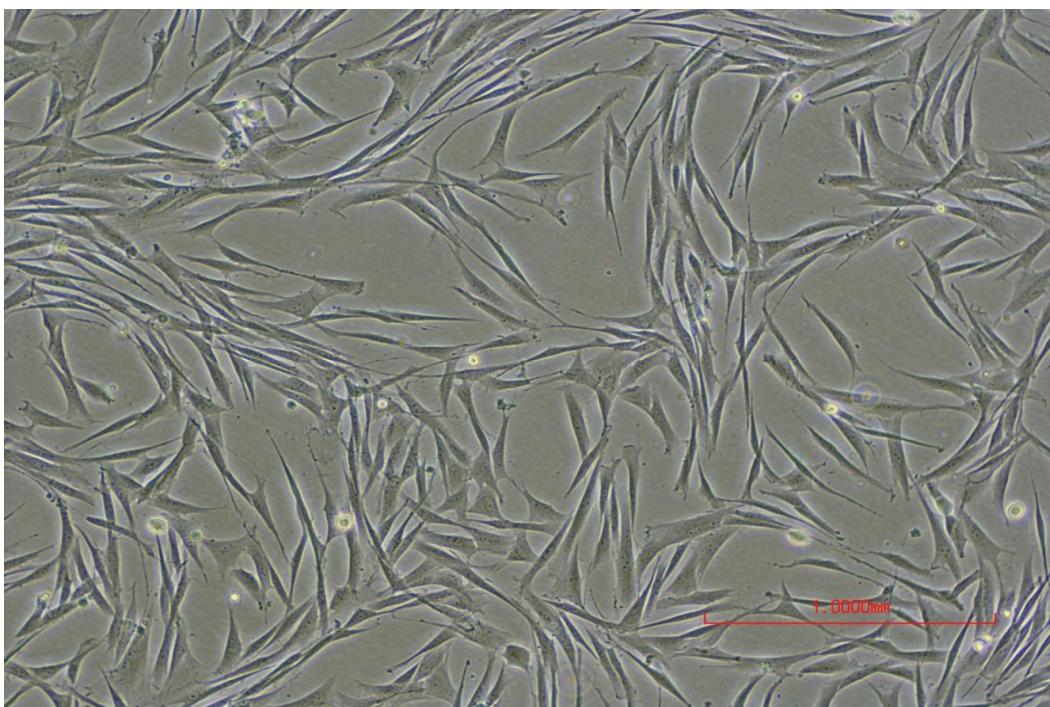
Fluorescenčna mikroskopija je najbolj uporabljeni tehnika za določanje celičnih antigenov v notranjosti ali na površini celičnih struktur. Tehnika je zasnovana na pojavu fluorescence, pri katerem lahko s svetlobo primerne valovne dolžine molekulo fluorokroma vzbudimo v višje energijsko stanje. Vzbujena molekula izseva foton ter preide nazaj v osnovno stanje. Na detektorju zaznamo signal izsevanega fotona. Prednost tehnike je, da lahko opazujemo celice pri fizioloških pogojih, slabost pa omejenost z valovno dolžino elektromagnetnega valovanja.

Konfokalna mikroskopija predstavlja drugo tehniko fluorescenčne mikroskopije s tem, da omogoča 3D združevanja nastalih slik. Pri našem poskusu smo uporabili oba pristopa. Fluorescenčni mikroskop (Nikon eclipse 80i) smo uporabili za poskus izveden na Veterinarski fakulteti v sklopu podjetja Animacel s programom za obdelavo slik NIS – Elements D3.2 Live quality. Za posnete slike pri različnih povečavah smo upoštevali različne parametre kot sta ojačenje signala (angl. *gain*) in izpostavitev elektronskega tipala fotoaparata svetlobi (angl. *exposure*), npr. pri 4x (ojačenje: 2,80x in izpostavitev: 1/250 s); 10x (ojačenje: 3,40x in izpostavitev: 1/60 s); 20x (ojačenje: 6,8x in izpostavitev: 1/40 s); 40x (ojačenje: 6,8x in izpostavitev: 1/20 s). Konfokalni mikroskop (Zeiss LSM 710 3 – Channel Confocal Microscope) smo uporabili na Univerzi v Oslu in za obdelavo slik pa program ZEN.

4 REZULTATI

4.1 MORFOLOGIJA

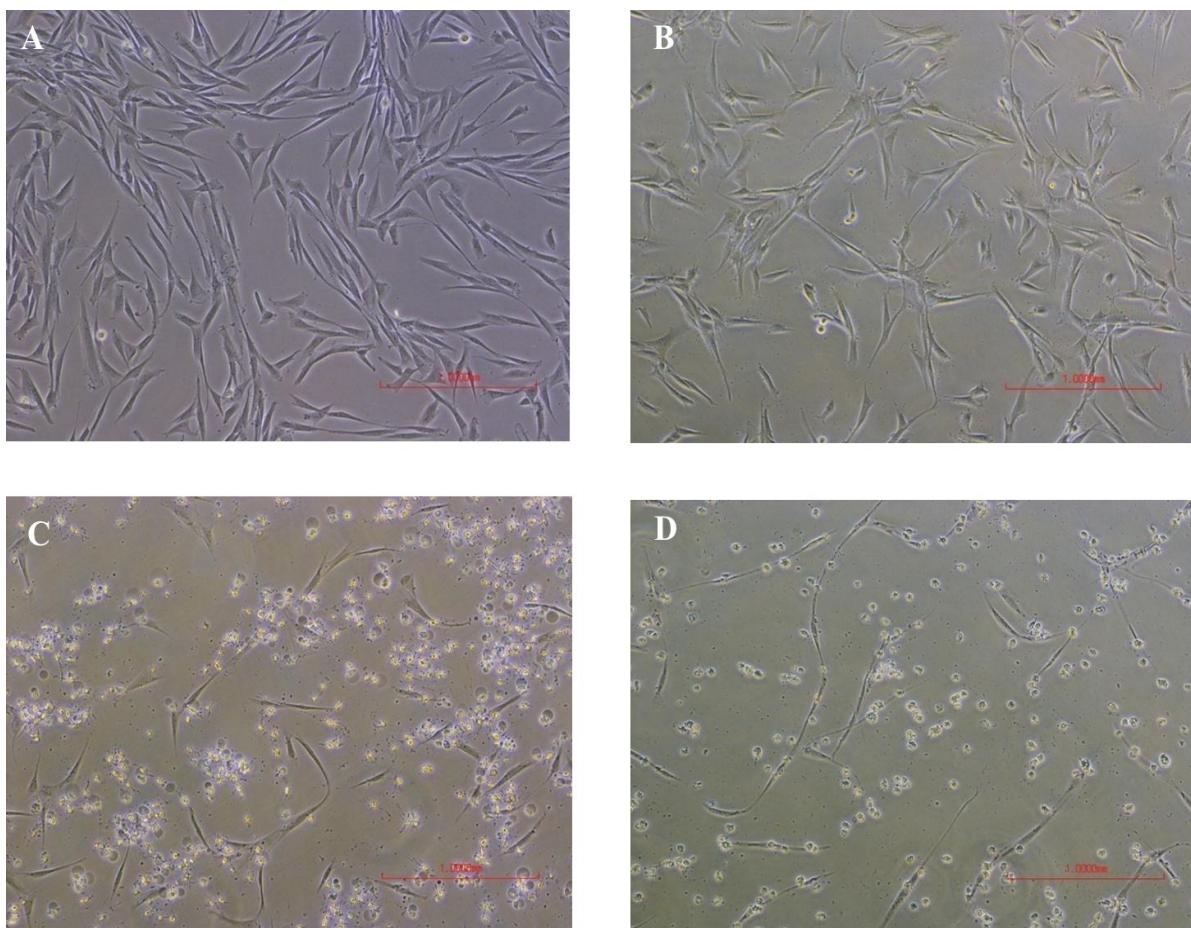
Najbolj razširjen način preučevanja izgleda in strukture celic v celični kulturi, iz katerega dobimo veliko pomembnih informacij o različnih vrstah celic, je nesporno morfološko preučevanje celic. V predhodnem delu raziskav smo spremljali morfološke spremembe pod svetlobnim mikroskopom v celičnih kulturah, ki smo jih tretirali z različnimi diferenciacijskimi gojišči: NIMa, NIMb, NIMc in KEM. Izbrali smo pet točk, pri katerih smo spremljali morfološke spremembe: nediferencirane, pre-diferenciacija, 3, 6 in 9 dni po transdiferenciaciji v ustreznem mediju. Izjemoma smo za gojišče KEM imeli štiri točke: nediferencirane, pre-diferenciacija, 1 in 3 dni po transdiferenciacij, saj je število celic upadal ter pri šestemu dnevnu nismo imeli več živih celic. Glede na morfologijo in konfluentnost mezenhimskih matičnih celic v kulturi smo se odločali, ali nadaljujemo s transdiferenciacijo ali pa pustimo, da celice rastejo do naslednjega dne. Ko so celice v gojitvenih posodicah dosegle 80 % konfluentno stanje (**slika 16**), smo jim dodali pred-diferenciacijsko gojišče ter po 24 urah še ustrezeno diferenciacijsko gojišče.



Slika 16: Osamljene mezenhimske matične celice iz maščobnega tkiva psa v rastnem gojišču Animacel. Merilna skala posneti fotografiji je 1 mm.

Med spremjanjem morfoloških sprememb smo ugotovili, da gojišče KEM zelo toksično deluje na celice, saj je bilo videti veliko plavajočih mrtvih celic na površini gojitvenega medija (**slika 17**). Pod črko A so prikazane nediferencirane MMC celice takoj po nasaditvi v gojitvene posodice, tretirane z rastnim gojiščem Animacel, pod črko B pa smo MMC tretirali 24 ur s pred-diferenciacijskim medijem STIM2. Vidimo, da se je celično jedro

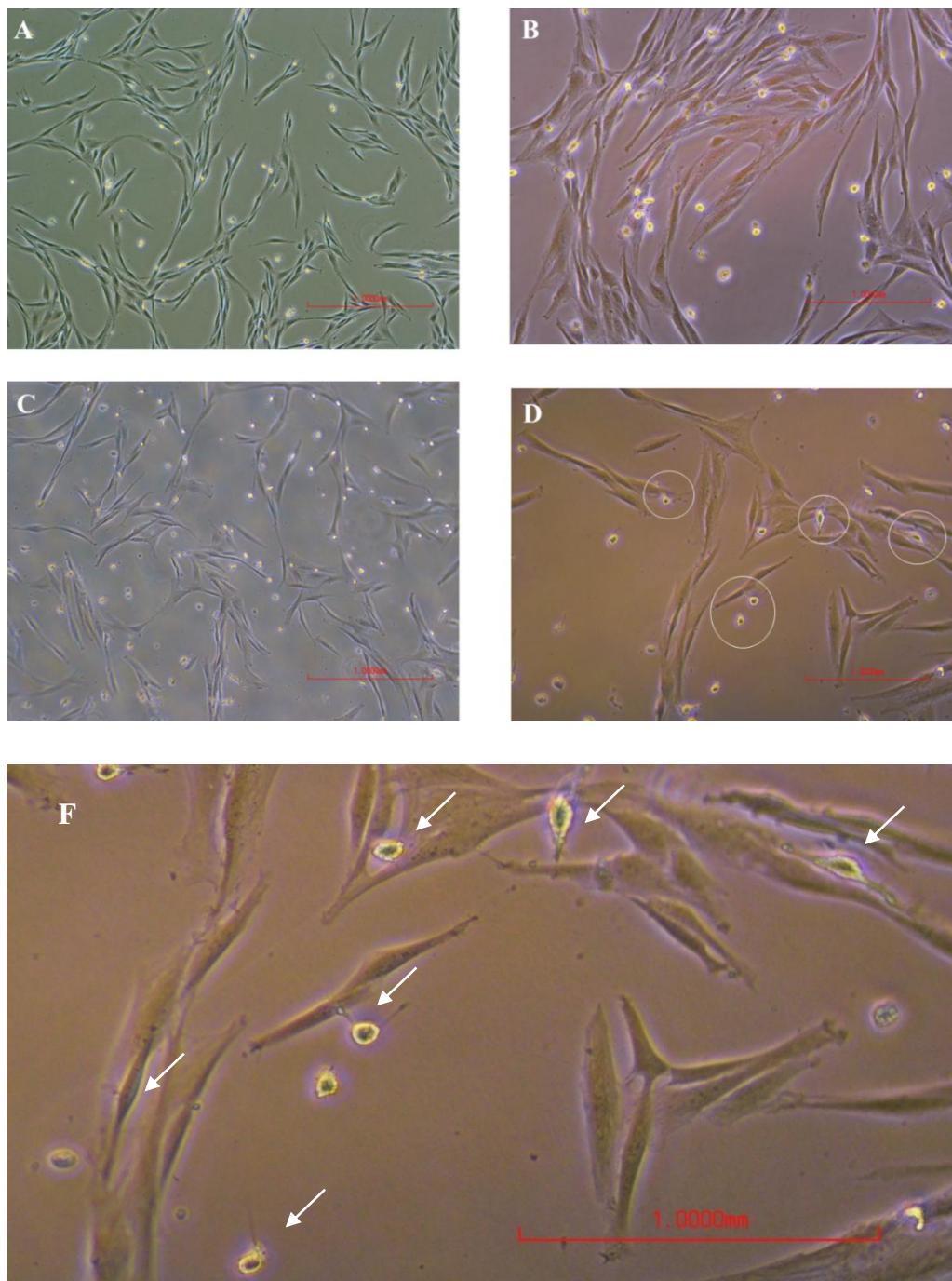
povečalo in da so celice postale podolgovate. Pod črko C smo celice prvi dan tretirali z diferenciacijskim gojiščem KEM. Na površini gojišča plavajo mrtve odlepljene celice z dna gojitvene posode, kar je posledica toksičnega vpliva na celice. Pri črki D po tretjem dnevu tretiranja z diferenciacijskim medijem KEM opazimo, da so pritrjene celice pridobile podolgovato celično strukturo, ki spominja na odrasle živčne celice. Vendar zaradi majhnega števila celic in pomankanja komunikacije opazimo še višjo stopnjo mrtvih celic, ki plavajo po površini gojišča za transdiferenciacijo.



Slika 17: **Morfološke spremembe pasjih MMC po tretiranju z diferenciacijskem gojiščem KEM. Merilna skala posnetih fotografij je 1 mm.** **A:** nediferencirane MMC celice takoj po nasaditvi v gojitvenih posodicah tretiranih z rastnim gojiščem Animacel. **B:** 24 ur tretirane MMC s pre-diferenciacijskimi medijem STIM2; **C:** prvi dan tretiranja z diferenciacijskim medijem KEM; **D:** tretji dan tretiranja z diferenciacijskim medijem KEM.

Podatkov za STIM2 nimamo, saj je bilo veliko mrtvih celic in nismo opazili posebnih morfoloških sprememb. Zato smo se odločili, da bo naše pre-diferenciacijsko gojišče STIM1. Prve morfološke spremembe smo opazili po 48 urah tretiranja MMC s STIM1 v pre-diferenciacijskem gojišču, saj so bile prisotne majhne plavajoče strukture, ki imajo dolge izrastke, s katerimi se držijo na plastični površini gojitvene posodice. Poleg tega imajo tudi okroglo obliko in zelo svetlo celično jedro (**slika 18**). V literaturi jih imenujejo nevrosfere,

ki predstavljajo celične aggregate urejene v tri dimenzionalni strukturi. Največkrat se pojavijo, ko osamljene MMC iz maščobnega tkiva tretiramo z medijem, ki vsebuje serum v kombinaciji z rastnimi dejavniki kot sta EGF in FGF (Ferroni in sod., 2013).



Slika 18: Morfološke spremembe pasjih MMC po tretiranju s pre-diferenciacijskim gojiščem STIM 1 **A:** po 24 urah tretiranja, slikano pri 10x povečavi; **B:** po 24 urah tretiranja, slikano pri 20x povečavi; **C:** po 48 urah tretiranja, slikano pri 10x povečavi; **D:** po 48 urah tretiranja, slikano pri 20x povečavi. Pri tem smo opazili prve oblike nevrosfernih oblik z močno bleščečimi jedri; **F:** Podrobnejši prikaz nevrosfernih oblik.

Po izboru pre-diferenciacijskega gojišča smo nadaljevali s selekcijo diferenciacijskih gojišč, ki so vsebovala različno koncentracijo retinojske kisline. Slika 19 je bila posneta na Univerzi v Oslu, kjer smo opazili prve morfološke spremembe pasjih MMC po 48 urah tretiranja s pre-diferenciacijskim gojiščem STIM 1 in diferenciacijskem gojiščem NIMA. Število nevrosfer se je povečalo po treh dneh transdiferenciacije z NIMA (**Slika 19 – A in B**).

Po šestih dneh smo opazili bistvene morfološke spremembe, saj so se okrogle oblike spremenile v zvezdaste oblike z veliko izrastki, ki se prepletajo med seboj (**Slika 19 – C in D**). Po devet dnevnem tretiraju z NIMA vidimo, da so celice postale uniformne po celi površini gojitvene posodice. Zvezdaste oblike celic so postale bolj značilne, vendar pa izdrastki so se bistveno podaljšale in bolj prepletle z ostalimi celicami (**Slika 19- E in F**).

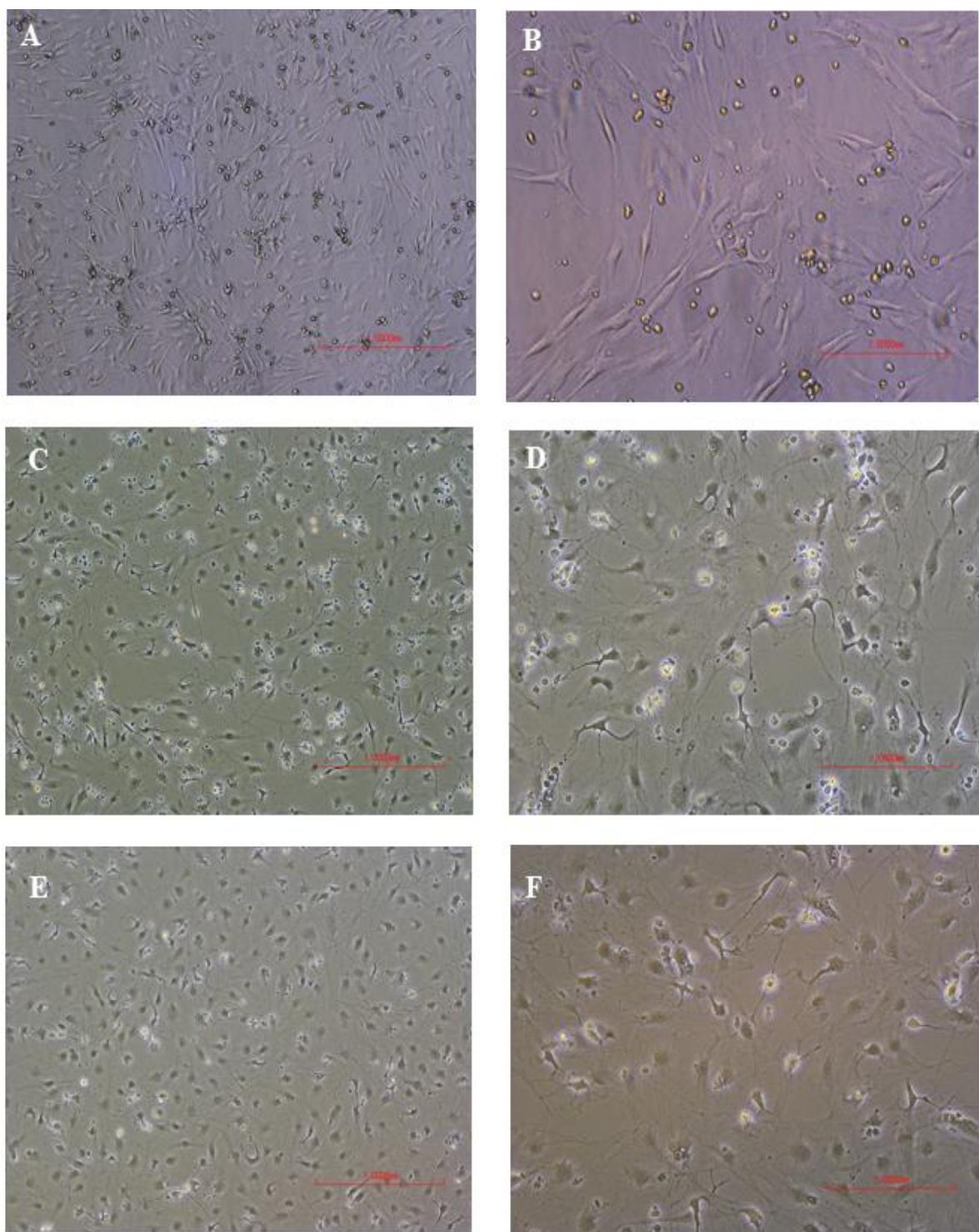
Ostali dve gojišči NIMb (vsebuje 100 nM retinojske kisline) in NIMc (vsebuje 10 µM retinojske kisline) sta tudi povzročili morfološke spremembe, vendar ne tako značilne kot smo jih opazili pri NIMA gojišču (**Priloga A in Priloga B**). Pri NIMb in NIMc smo opazili veliko apoptotičnih celic, saj lahko retinojska kislina deluje tudi toksično na celice, če je koncentracija v gojišču previsoka. Pokazali smo, da je najbolj primerno gojišče NIMA (vsebuje 10 nM retinojsko kislino) za transdiferenciacijo MMC v živčne celice.

V Centru za genomiko živali smo izvedeli isti poskus za vseh šest živali, pri tem da smo spremeljali morfološke spremembe pri različnih točkah transdiferenciacije pasjih MMC. Primerjali smo moške in ženske pasje MMC, ki smo jih 48 ur tretirali s pre-diferenciacijskim gojiščem STIM 1 in diferenciacijskim NIMA.

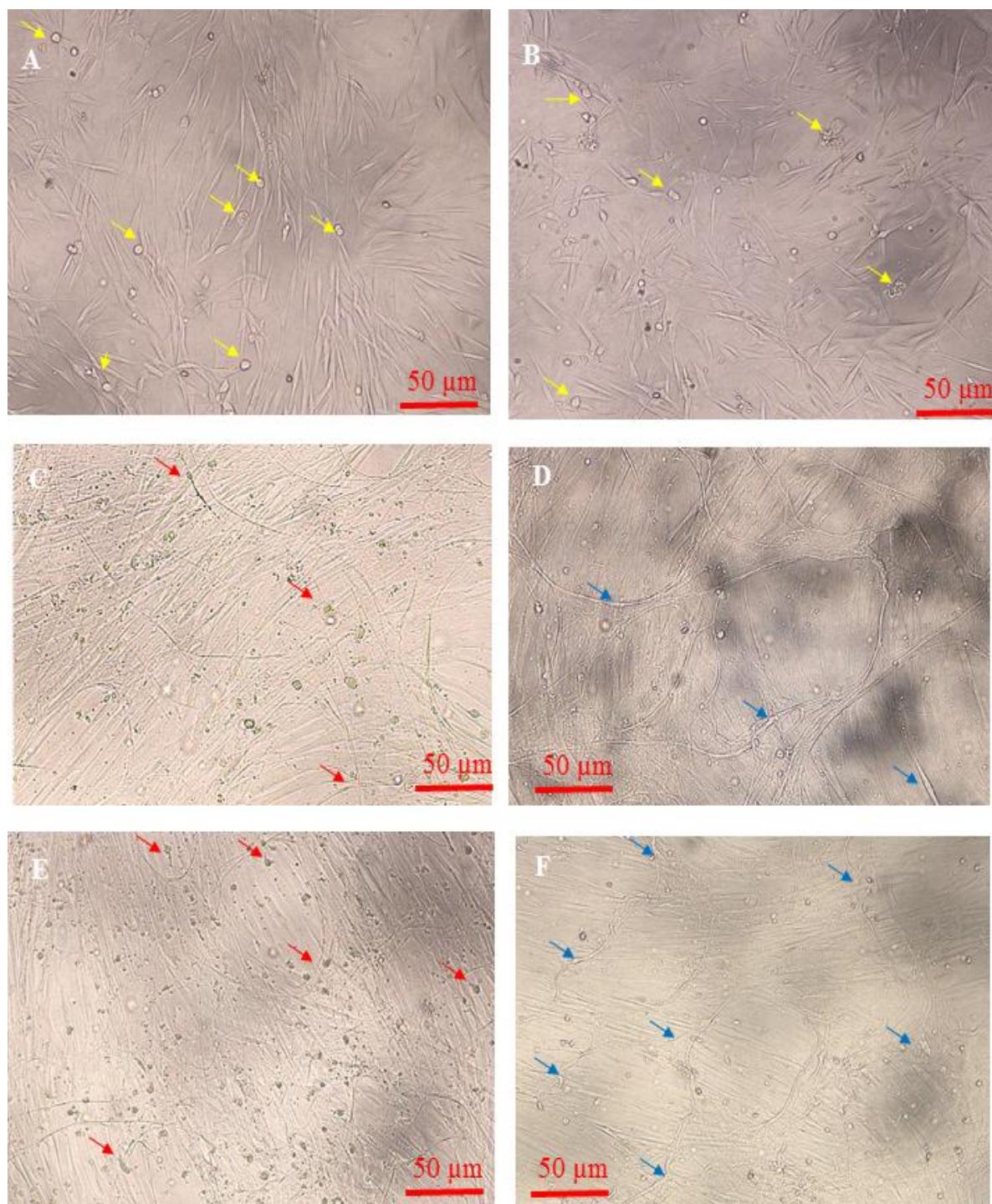
Po 48 urah tretiranja v gojišču STIM1 smo opazili prve nevrosferne oblike, ki smo jih označili z rumenimi puščicami, tako pri ženskih pasjih MMC (**Slika 20 – A**) kot pri moških pasjih MMC (**Slika 20 – B**).

Po treh dneh transdiferenciacije v gojišču NIMA smo pod svetlobnim mikroskopom opazili bistveno večje nevrosferne oblike, ki so odsevali svetlo zeleno. Ob tem smo opazili tudi zvezdaste celične oblike z velikimi jedri, ki so tvorile verigo in spominjale na odrasle živčne celice v kulturi. Te spremembe smo opazili tako pri moških kot pri ženskah in ponazorili z rdečimi puščicami (**Slika 20 – C**) in modrimi puščicami (**Slika 20 – D**). Nedvomno poleg transdiferenciranih MMC v celični kulturi opazimo tudi veliko število fibroblastov, ki imajo vretenčasto obliko z ostrimi robovi.

Po devetih dneh transdiferenciacije v gojišču NIMA smo opazili, da so se zvezdaste celične oblike začele povezovati med seboj, le v področjih gojitvene posodice kjer so bile celice gosto nasajene. Videli smo dolge nitkaste oblike celic s svetlimi jedri, ki so bili različno postavljeni. Z rdečimi (**Slika 20 – E**, ženski spol) in modrimi (**Slika 20 – F**, moški spol) puščicami smo ponazorili morfološke spremembe, ki spominjajo na odrasle živčne celice. Dejansko smo opazovali dolge nitkaste strukture, prepletene med seboj kot tudi s fibroblasti, ki so bili prisotni v celični kulturi. Skupaj so tvorili mrežo celic, ki komunicirajo med seboj. Obenem so bile prisotne tudi majhne zvezdaste strukture kot tudi veliko število nevrosvernih celičnih oblik.



Slika 19: Morfološke spremembe pasjih MMC po 48 urah tretiranja s pre-diferenciacijskim gojiščem STIM 1 in diferenciacijskem gojiščem NIMa; **A:** transdiferencirani MMC po 3 dnevnom tretiranju z NIMa, 10x povečava; **B:** transdiferencirani MMC po 3 dnevnom tretiranju z NIMa, 40x povečava; **C:** transdiferencirani MMC po 6 dnevnom tretiranju z NIMa, 10x povečava; **D:** transdiferencirani MMC po 6 dnevnom tretiranju z NIMa, 20x povečava; **E:** transdiferencirane MMC po 9 dnevnom tretiranju z NIMa, 10x povečava; **F:** transdiferencirane MMC po 9 dnevnom tretiranju z NIMa, 20x povečava;



Slika 20: Morfološke spremembe pri različnih točkah transdiferenciacije pasjih MMC. Primerjali smo moške in ženske pasje MMC, ki smo jih 48 ur tretirali s pre-diferenciacijskim gojičem STIM 1 in diferenciacijskim NIMA; **A:** Ženske MMC po 48 urah tretiranja s STIM, 10x povečava; **B:** Moške MMC po 48 urah tretiranja s STIM, 10x povečava; **C:** Ženske MMC po 3 dneh tretiranja z NIMA, 10x povečava; **D:** Moške MMC po 3 dneh tretiranja z NIMA, 10x povečava; **E:** Ženske MMC po 9 dneh tretiranja z NIMA, 10x povečava; **F:** Moške MMC po 9 dneh tretiranja z NIMA, 10x povečava; **rumene puščice** ponazarjajo prve nevrosferne oblike; **rdeče puščice** ponazarjajo morfološke spremembe pri ženskih MMC, ki spominjajo na živčne celice (veliko svetlo jedro in dolgi podaljški, ki spominjajo na dendrite); **modre puščice** ponazarjajo morfološke spremembe pri moških MMC, ki spominjajo na živčne celice.

4.2 VIABILNOST IN RASTNE KRIVULJE MMC V CELIČNI KULTURI MED SPREMLJANJEM TRANSDIFERENCIACIJE V TREH ČASOVNIH TOČKAH

Ključni parameter za uspešno transdiferenciacijo MMC v živčnih celicah je dovolj veliko število celic v gojitveni posodici. Transdiferenciacijo smo potrdili na osnovi morfoloških sprememb celic, ki smo jih opazili pod mikroskopom. Sledilo je štetje živih in mrtvih celic s hemocitometrom, celice smo pobarvali s tripan modrim barvilom. Začetna koncentracija celic, s katero smo začeli poskus transdiferenciacije, je bila 10^6 celic/ml za vse točke. Nato so bile celice gojene v rastnem mediju z namenom prilagoditve in razmnoževanja celic pred tretiranjem v diferenciacijskem gojišču NIMa.

Število celic/ml smo določili z izračunom po formuli 1 (**poglavje 3.2.5**). Za vsako žival smo imeli tri meritve in nato izračunali število celic/ml. V preglednici 12 so preračunane koncentracije za posamezno žival, ki so rezultat treh meritev, za katere smo preračunali povprečje. Nato smo preračunali geometrijsko sredino za vsako točko transdiferenciacije glede na spol. Izračunane vrednosti števila celic/ml med transdiferenciacijo glede na spol so naslednje: moški – nediferencirane $423.305,3 \pm 178.525,0$ celic/ml; moški – 3 dni $2.820.965,7 \pm 1.838.699,7$ celic/ml; moški – 9 dni $1.262.795,5 \pm 36.647,7$ celic/ml; ženski – nediferencirane $531.554,4 \pm 76.147,5$ celic/ml; ženski – 3 dni $4.463.209,1 \pm 1.698.853,2$ celic/ml; ženski – 9 dni $787.189,2 \pm 652.432,9$ celic/ml.

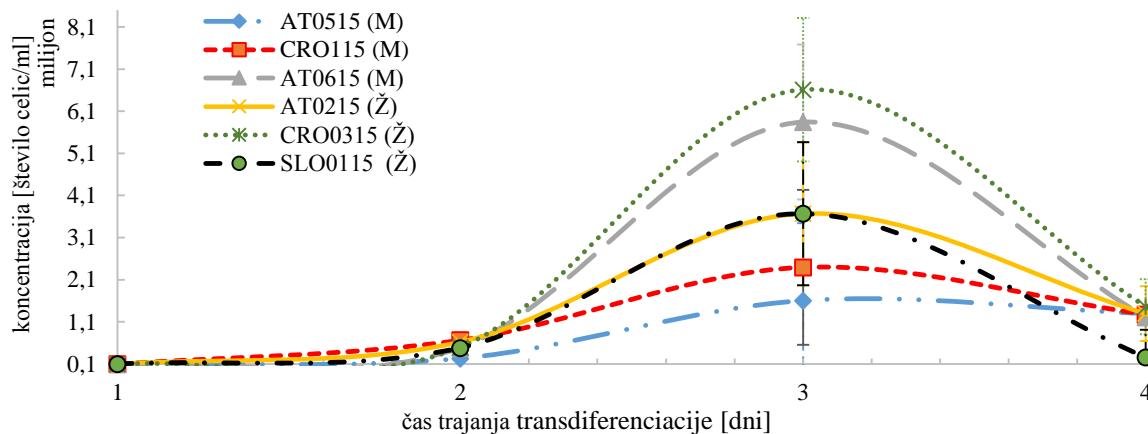
Preglednica 12: Preračunano število celic/ml (koncentracija) v različnih časovnih točkah za vsako žival posebej ter geometrijska sredina ob združitvi treh živali glede na spol.

		Koncentracija [celic/ml]				Geometrijska sredina [celic/ml]		
Spol	Oznaka	Začetno št.celic	nedife-rencirane	3 dni	9 dni	nedif	3 dni	9 dni
M	AT0515	100.000,0	232.500,0	1.605.000,0	1.297.500,0	423.305,3	2.820.965,7	1.262.795,5
	CRO115	100.000,0	667.500,0	2.395.000,0	1.280.000,0			
	AT0615	100.000,0	488.750,0	5.840.000,0	1.212.500,0			
Ž	AT0215	100.000,0	622.500,0	3.667.500,0	1.297.500,0	531.554,4	4.463.209,1	787.189,2
	CRO0315	100.000,0	498.750,0	6.610.000,0	1.460.000,0			
	SLO0115	100.000,0	483.750,0	3.667.500,0	257.500,0			

Po izvedeni statistični analizi (t-test analiza) smo potrdili našo ničelno hipotezo, da nismo opazili razlike glede na koncentracije celic med transdiferenciacijo v gojišču NIMa pri treh časovnih točkah, kot tudi med spoli. Določene p-vrednosti so višje od 0,05 (enkratna standardna deviacija pri 95 % intervala zaupanja). To pomeni, da rezultati niso statistično značilni. Izrisali smo rastne krivulje za vsako žival vključeno glede na preračunano koncentracijo v treh časovnih točkah (Slika 21).

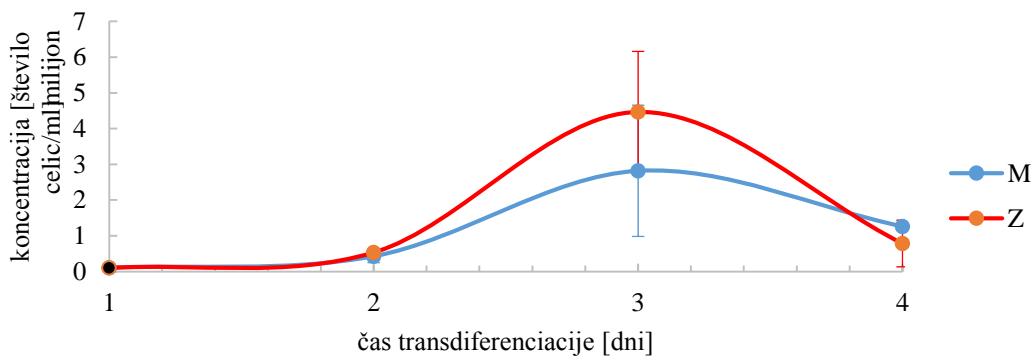
Preglednica 13: Statistična analiza podatkov število celic/ml tretirani v gojišču NIMa v treh časovnih točkah.

Spol	Oznaka	Standardna deviacija (STDEV.P)			p-vrednost pri enkratni standardni deviaciji					
		nediferencirane	3 dni	9 dni	nedef	3 dni	9 dni			
M	AT0515 (M)	178.525,0	1.838.699,7	36.647,7	0,32	0,23	0,28			
	CRO115 (M)									
	AT0615 (M)									
Ž	AT0215 (Ž)	76.147,5	1.698.853,2	652.432,9						
	CRO0315 (Ž)									
	SLO0115 (Ž)									
				p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05				



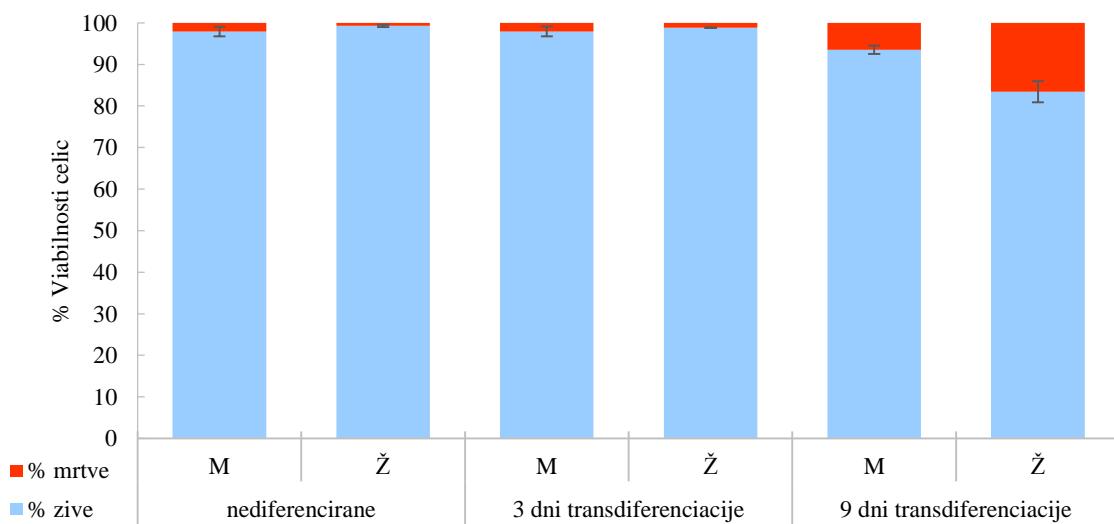
Slika 21: Rastne krivulje za vse živali, vključene v poskusu transdiferenciacije MMC v živčne celice. Na x osi točka 1 pomeni nasaditev začetnega števila celic za poskus; točka 2 pomeni število celic, ko smo začeli s tretiranjem MMC najprej z STIM 1 gojiščem ter nato po 48 urah zamenjali NIMA gojišče; točka 3 pomeni število celic po 3 dneh transdiferenciacije; točka 4 pomeni število celic po 9 dneh transdiferenciacije.

S pomočjo rastnih krivulj celice smo spremljali spreminja koncentracije [celic/ml] v odvisnosti od časa tretiranja MMC v gojišču NIMA. Čeprav rezultati niso statistično značilni, iz grafa (Slika 22) opazimo, da pri ženskem spolu koncentracija celic/ml iz 4,5 miljonov [celic/ml] pada (3 dni transdiferenciacije) na 0,7 miljonov [celic/ml] (9 dni transdiferenciacije) in iz 2,8 miljonov [celic/ml] (3 dni transdiferenciacije) pade na 1,3 miljonov [celic/ml] (9 dni transdiferenciacije) pri moškem spolu.



Slika 22: Rastne krivulje tretiranih MMC glede na spol, iz katerega so osamljene. Rastna krivulja je izrisana od začetne koncentracije do preračunane koncentracije pri 9 dnevni transdiferenciaciji. Na x osi prva točka 1 pomeni nasaditev začetnega števila celic za poskus; točka 2 pomeni število celic, ko smo začeli s tretiranjem MMC najprej s STIM 1 gojišče ter nato po 48 urah zamenjali NIMA gojišče; točka 3 pomeni število celic po 3 dneh transdiferenciacije; točka 4 pomeni število celic po 9 dneh transdiferenciacije.

Viabilnost celic smo preračunali po formuli 2, opisani v **poglavlju 3.2.5.2**, tako da smo podatke o viabilnosti celic statistično obdelali na podoben način kot za rastne krivulje. Preračunali smo geometrijsko sredino vrednosti treh živali iz istega spola. Po izvedeni statistični analizi (t-test analiza, en rep, različne variance) smo ugotovili, da je p-vrednost pri nediferencirah in 3 dni transdiferenciranih živčnih celicah statistično neznačilna ($p > 0,05$). Po 9 dneh transdiferenciacije v gojišču NIMA smo ugotovili statistično značilnost podatkov, kajti p-vrednost je nižja od 0,05 (enkratna standardna deviacija pri 95 % intervala zaupanja). Pri spremeljanju odstotka viabilnosti (% živosti) celic smo ugotovili, da odstotek viabilnosti začne padati pri 9 dnevni transdiferenciaciji MMC pod 80 %, vendar le pri MMC osamljenih iz ženskega spola. Statistično obdelani rezultati za viabilnost celic skozi časovne točke transdiferenciacije so prikazani v **Prilogi G**.



Slika 23: Prikaz viabilnosti MMC med transdiferenciacijo združenih glede na spol, iz katerega smo MMC osamli.

Izračunane vrednosti viabilnosti za moški spol so naslednje: $97,91 \pm 1,2\%$ žive in nediferencirane; $97,92 \pm 1,2\%$ žive in 3 dni transdiferencirane; $93,50 \pm 1,0\%$ žive in 9 dni transdiferencirane ter poročani vrednosti za ženski spol: $99,27 \pm 0,3\%$ žive in nediferencirane; $98,83 \pm 0,04\%$ žive in 3 dni transdiferencirane; $83,40 \pm 2,3\%$ žive in 9 dni transdiferencirane.

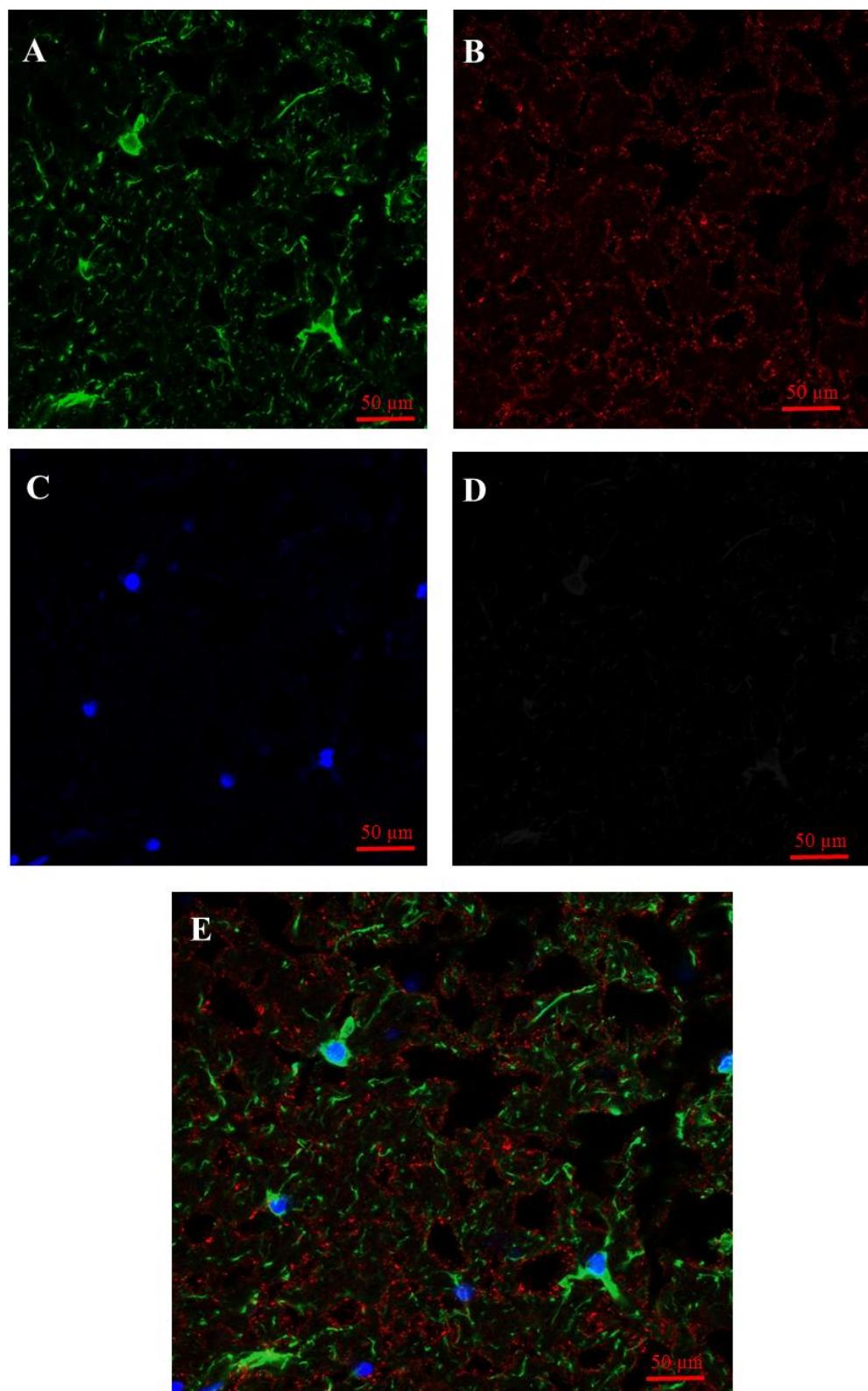
4.3 IMUNOBARVANJE

Uporabljali smo posredno metodo imunobarvanja s protitelesi za določanje ciljnih označevalcev, ki so značilni za dokazovanje transdiferenciacije MMC v živčne celice. Za iskanje ustreznih protiteles smo uporabili pasje možgane, ki so predstavljali tudi našo pozitivno kontrolo. Testirana protitelesa na pasjih možganih so opisana v **preglednici 9**. Izbrali smo ustreza protitelesa in nadaljevali z gojenjem in transdiferenciacijo MMC v živčne celice. Med optimizacijo smo uporabili protitelesa opisana v **preglednici 10**, za končno karakterizacijo transdiferenciranih MMC v celični kulturi smo uporabili protitelesa proti GFAP, NF-H in MAP2. Negativno kontrolo transdiferenciacije so predstavljale nediferencirane MMC, ki smo jih tretirali na enak način kot transdiferencirane MMC.

4.3.1 Imunobarvanje pasjih možganskih rezin

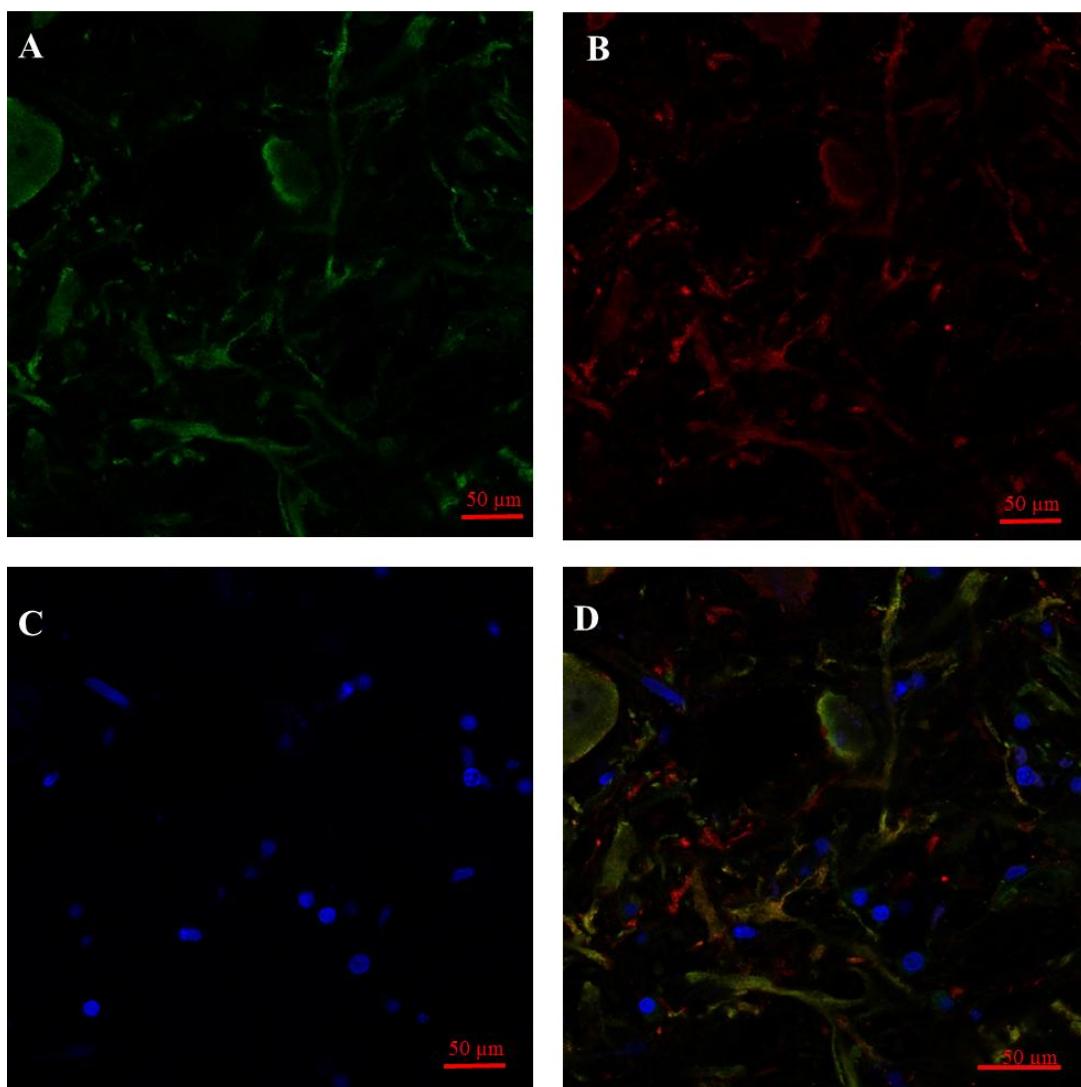
S pomočjo imunobarvanja pasjih možganov (koščki sive mase možganov) smo izbrali ustreza primarna protitelesa proti specifičnim označevalcem živčnega sistema. V naši raziskavi smo testirali različna primarna protitelesa, značilna za celice živčnega sistema. Določili smo, da se kunčja protitelesa za GFAP in MAP2 proti pasjim antigenom vežejo najbolje. Nato smo uvrstili mišje protitelo proti Nf-pan in β III tubulinu. Za kokošje protitelo proti nestinu nismo dobili specifičnega signala. Rezultata ne moramo posploševati tudi za ostale pasje antogene (npr. za označevanje hrustančnih ali kostnih celic), vendar le za naša izbrana celična označevalca. Izbor primarnega protitelesa in določanje optimalne koncentracije protitelesa sta ključna parametra za uspešno izvedeno metodo imunobarvanja. Na **sliki 24** in **sliki 25** smo prikazali rezultate imunobarvanja tkivnih rezin, posnete s pomočjo konfokalne mikroskopije na Univerzi v Oslu.

Določili smo signal (**slika 24-A, na sliki je GFAP obarvan z zeleno barvo**) za GFAP protein s pomočjo monoklonskega kunčjega protitelesa razreda IgG proti kisli fibrilarni beljakovini (GFAP) in nato označeno s sekundarno kozje protitelo proti kunčemu IgG – Alexa 488. Namreč, GFAP je celični označevalec za oporne celice živčnega sistema, ki imajo zvezdaste oblike in so najbolj razširjena vrsta glijskih celic v osrednjem živčevju. Določili smo signal (**slika 24-B, NF-pan obarvan z rdečno barvo**) za NF-pan protein s pomočjo mišjega protitelesa razreda IgG proti nevofilamentu pan označeno s sekundarnim kozjim protitelesom proti mišemu IgG – Cy3.



Slika 24: Pasje možganske rezine sive mase, označene s protitelesi proti specifičnim živčnim celicam. Podatki o protitelesih so zabeleženi v preglednici 9. A: zeleno označen GFAP; B: rdeče označen NF-pan; C: modro označena celična jedra s Hoechst barvilo; D: negativni signal za Nestin, celični obrisi se vidijo v svetlo sivi barvi; E: Združene vse slike od A do D.

Določili smo signal (**slika 25-A, na sliki je MAP2 obarvan z zeleno barvo**) za MAP2 protein s pomočjo kunčjega protitelesa razred IgG, proti mikrotubularnem proteinu 2 in nato primarno protitelo označili s sekundarnim kozjim protitelesom proti kunčjemu IgG – Alexa 488. Določili smo signal (**slika 25-B, β III tubulin obarvan z rdečno barvo**) za protein β III tubulin s pomočjo mišjega protitelesa razreda IgG proti β III tubilinu označeno s sekundarno kozje protitelo proti mišjemu IgG – Cy3. Oba proteina (MAP2 in β III tubilin) sta komponenta mikrotubulinov, ki se izražata v citoskeletu odraslih živčnih celic. Pričakovano smo dobili signal o prisotnosti teh dveh označevalcev na podobnih mestih znotraj celičnega mikroskeleta odraslih živčnih celic.



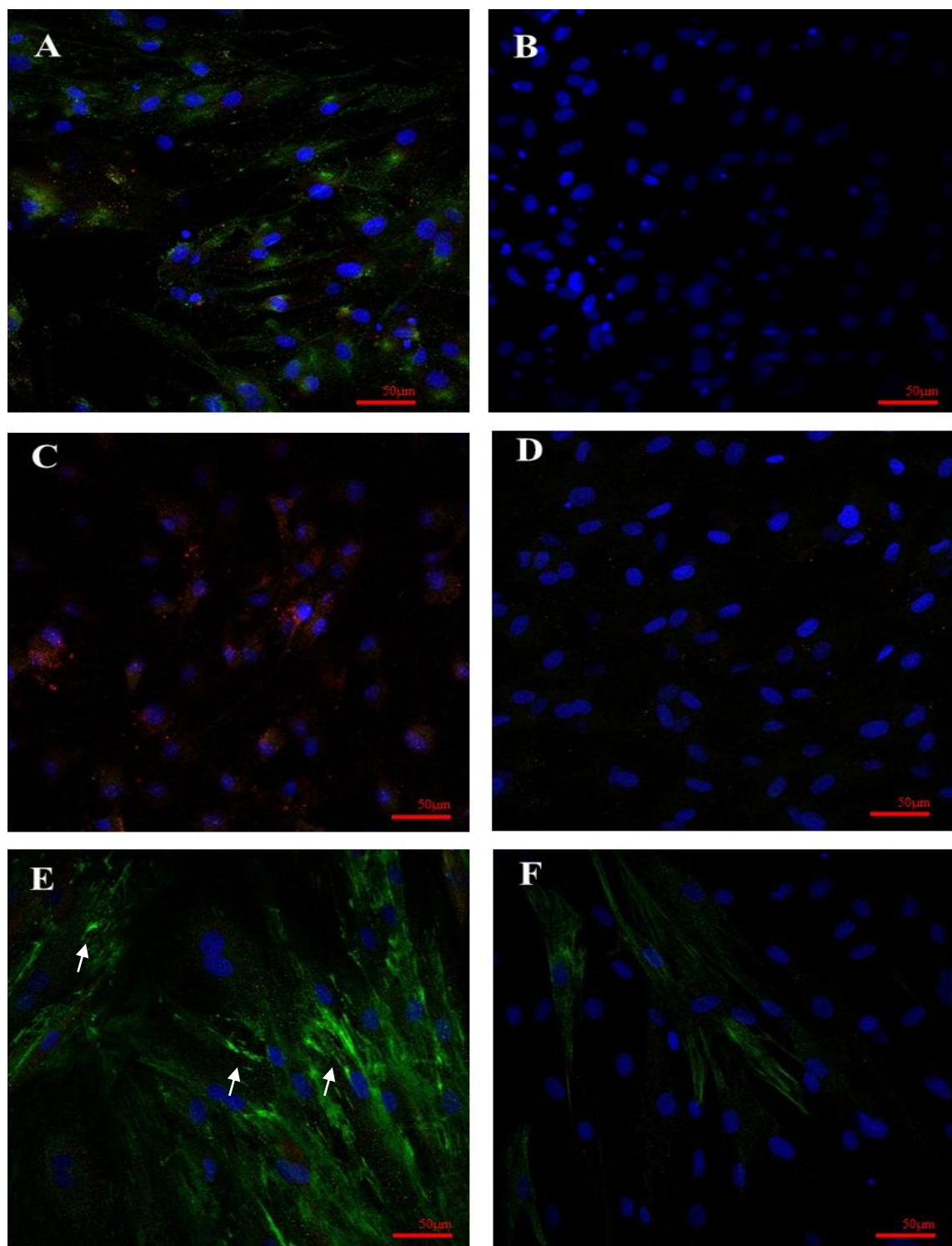
Slika 25: Pasje možganske rezine sive mase označene s protitelesi proti specifičnim živčnim celicam. Podatki o protitelesi so zabeleženi v preglednici 9. A: zeleno označen MAP2; B: rdeče označen β III tubilin; C: modro označena celična jedra s Hoechst barvilom; D: Združene slike od A do C.

4.3.2 Karakterizacija pasjih MMC iz maščobnega tkiva z imunobarvanjem po 3 in 9 dneh transdiferenciacije v NIMa gojišču

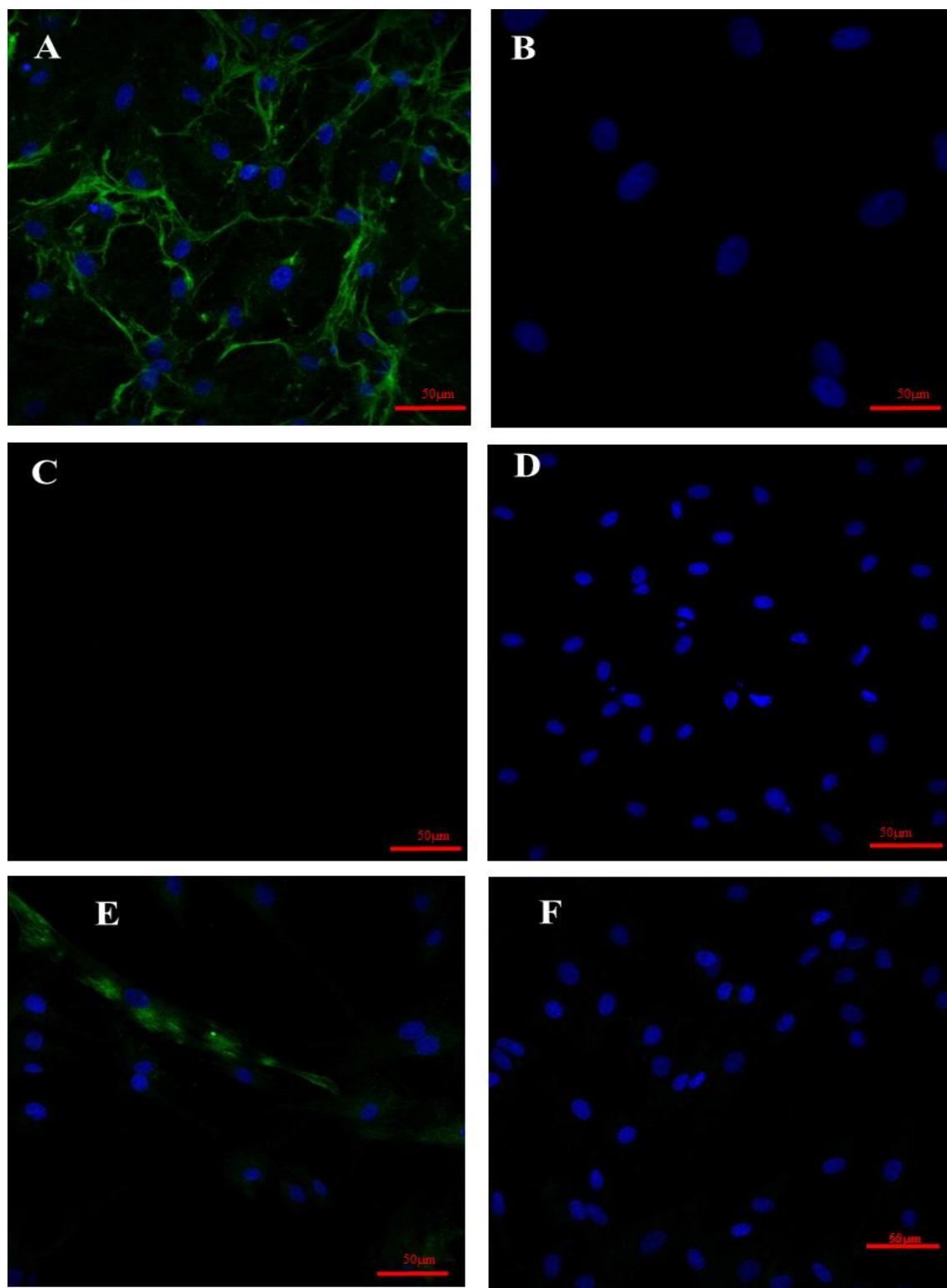
V predhodnem delu naloge smo testirali mišja, kunčja in kokošja protitelesa proti različnim živčno-specifičnim antigenov za karakterizacijo transdiferencianih pasjih MMC v živčne celice. Podrobnejši podatki o uporabljenih protitelesih so opisani v **preglednici 10**. S pomočjo imunohistokemije možganskih rezin smo ugotovili, da so kunčja protitelesa najbolj primerna za zaznavanje pasjih antigenov izključno za naš poskus in naše izbrane celične označevalce (GFAP, MAP2, β III tubulin, NF-H). Pasje mezenhimske matične celice ženskega spola smo tretirali 3 in 9 dni v diferenciacijskem gojišču NIMa. Celice smo predhodno pritrdirali na krovna stekelca, prevlečena z lamininom, in nato nadaljevali z izvedbo metode imunohistokemije. Uporabljali smo konfokalno mikroskopijo na Univerzi v Oslu ter posnete slike obdelali s programom ZEN, tako da smo iz ozadja odšteli signal negativne kontrole.

Ugotovili smo, da se po trodnevnom tretiranju v NIMa gojišču izraža celični označevalec GFAP, ki je specifičen za celice glija. Če podrobno pogledamo modroobarvana celična jedra, lahko ugotovimo, da imajo transdiferencirane celice bistveno manjša jedra od ostalih celic, ki so prisotne v mešani celični kulturi (**Slika 26-E**), vendar imajo glede na razmerje velikosti celic transdiferencirane celice velika jedra. Pri negativni kontroli sekundarnega protitelesa smo zaznali nespecifični signal, ki ponazarja zelenoobarvane celične filamente MMC v kulturi (**Slika 26-F**). Nato smo opazili celičnoobarvanje citoskeletalnih filamentov β III tubulin okoli celičnega jedra, kar je zelo značilna lokacija za ta protein (**Slika 26-A**) kot tudi označevalca PAX6 - prepisovalni dejavnik, ki se izraža pri nekaterih nevro-predniških celicah (**Slika 26-C**).

Po devetih dneh tretiranja v NIMa gojišču se zgodba nekoliko spremeni, tako da so bolj prisotni znotraj celični filamenti NF-H in označevalca MAP2, specifični za živčne celice. Določili smo signal za celični označevalec NF-H po celotni površini krovnega stekelca, kjer so bile celice pritrjene. Na **Sliki 27-A** so prikazane zelenoobarvane dolge, nitkaste oblike celic, ki tvorijo mrežo med seboj in glede na strukturo spominjajo na nevrofilamente pri odraslih živčnih celicah. Določili smo tudi signal za celični označevalec MAP2, ki je mikrotubularni protein, prisoten v citoskeletu odraslih živčnih celic, in ima pomembno vlogo pri razvoju in ohranjanju strukture podaljškov živčnih celic (**Slika 27-E**). Zato smo za nadaljnji poskus, ki smo ga izvedli v Centru za genomiko živali (Veterinarska fakulteta UL v Ljubljani) izbrali monoklonsko kunčje protitelo proti GFAP proteinu, kunčje protitelo proti MAP2 proteinu in kunčje protitelo proti NF-H proteinu za oba spola in za vse tri točke transdiferenciacije. Izjemoma so se MMC po 9 dneh transdiferenciacije pri ženskemu spolu začele odlepljati iz lamininske podlage zaradi premajhnega števila celic. Zato nismo uspeli posneti slik, pri katerih smo karakterizirali transdiferencirane pasje MMC iz maščobnega tkiva (nediferencirane, 3 dni in 9 dni po transdiferenciaciji). Rezultati so prikazani v **Prilogi C** in **Prilogi D**.



Slika 26: Tri dnevno tretirane MMC, ženskega spola z NIMa gojiščem v predhodnem poskusu. **A:** zeleno označen β III tubulin in negativni signal za NF-pan; **B:** negativna sekundarna kontrola – Cy2; **C:** rdeče označena β III tubulin in rdeče označena Pax6; **D:** negativna sekundarna kontrola – Cy3; **E:** zeleno označen GFAP; **F:** negativna sek. kontrola– Alexa 488. Modro označena so celična jedra s Hoechst barvilom.

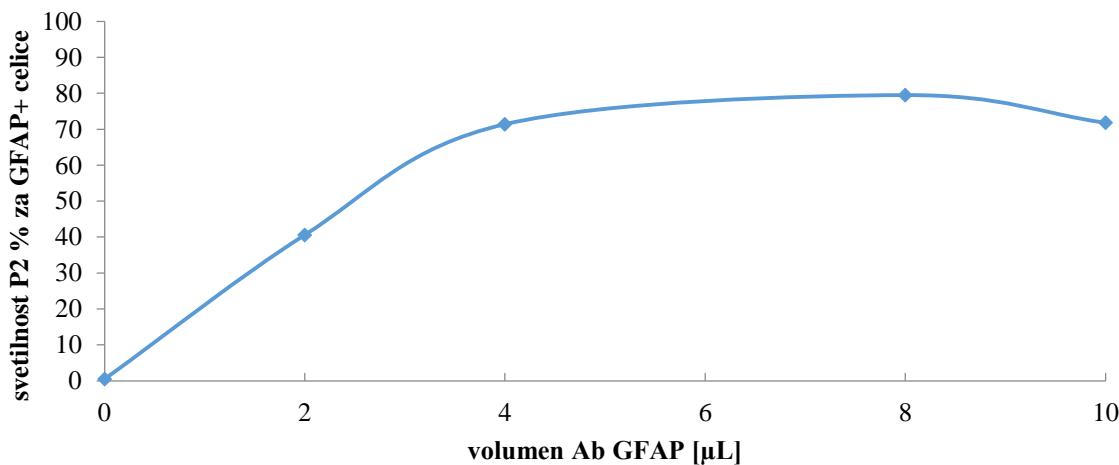


Slika 27: Devet dni tretirane MMC, ženskega spola z NIMa gojiščem v predhodnem poskusu. **A:** zeleno označen NF-H; **B:** negativna sekundarna kontrola—Cy2; **C:** negativni signal nestina; **D:** negativna sekundarna kontrola—Alexa 647; **E:** zeleno označen MAP2; **F:** negativna sekundarna kontrola – Cy2. Modro označena so celična jedra s Hoechst barvilom.

4.4 PRETOČNA CITOMETRIJA

4.4.1 Titracijska krivulja vezave monoklonskega protitelesa GFAP - Alexa Fluor 488 na transdiferenciranih celicah

Po vezavi protitelesa GFAP z Alexa Fluor 488 je bila njegova koncentracija v mešanici ~2,4 mg/ml. Naš namen je bil ugotoviti najbolj optimalno redčitev, pri kateri se monoklonsko protitelo, vezano z barvilom Alexa Fluor 488, veže na GFAP v transdiferenciranih celicah. Za določitev najnižje količine protiteles, uporabljenih za poskus, izberemo tisto količino, pri kateri je signal oddajane svetlobe okoli 80 % od najvišjega signala na pretočnem citometru ali primerjamo s priporočili proizvajalca. Na tak način uporabimo majhno količino protitelesa in zmanjšamo stroške za poskus. Pri naši titracijski krivulji se je izkazalo, da je najbolj optimalno območje med 4 µl (redčitveni faktor 1:400) in 8 µl (redčitveni faktor 1:200) dodanega volumna protiteles GFAP k celicam. Uporabili smo redčitev 1:400.



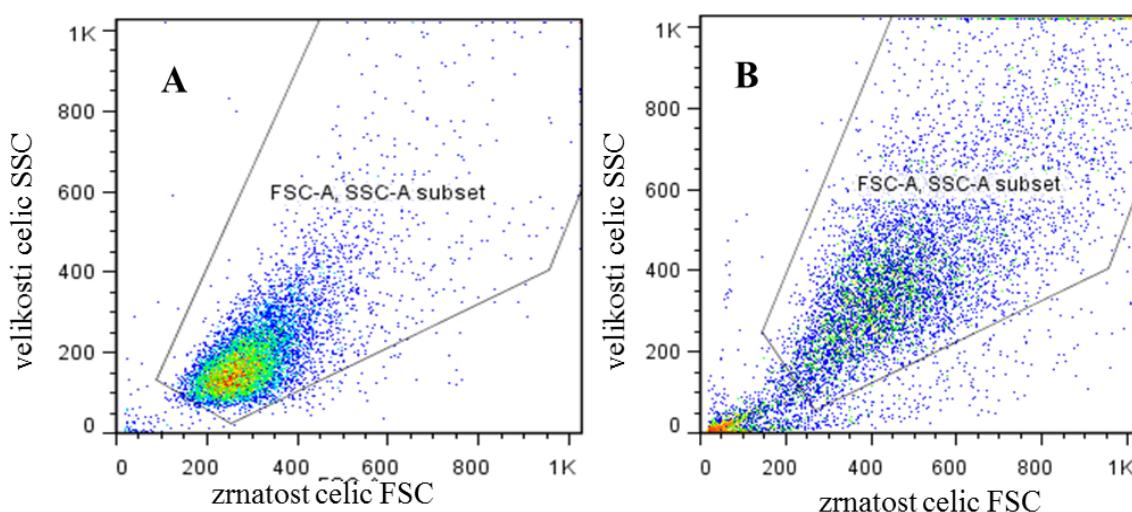
Slika 28: Titracijska krivulja protitelesa GFAP, ki je bil vezan z barvilom Alexa Fluor 488.

4.4.2 Karakterizacija pasjih MMC iz maščobnega tkiva s pretočno citometrijo po 3 in 9 dneh transdiferenciacije v NIMa gojišču

S pomočjo pretočne citometrije smo spremljali prisotnost celičnih označevalcev GFAP, MAP2 in NF-H med procesom transdiferenciacije. Za prvo in drugo časovno točko smo poskus ponovili dvakrat, za tretjo točko smo sicer poskus izvedli dvakrat, vendar izmerili enkrat na pretočnem citometru. Razlog je bil v številu celic, viabilnost je padla na 70 % in nismo mogli zagotoviti kriterija 1×10^6 celic v 100 µL za vsak celični označevalc. Za vsako žival pri vseh označevalcih smo imeli negativno kontrolo nediferenciranih in neoznačenih MMC ter negativno kontrolo sekundarnih protiteles, ki so bila tretirana pod istimi pogoji kot transdiferencirane celice. Pri prvi negativni kontroli smo namesto primarnih in sekundarnih

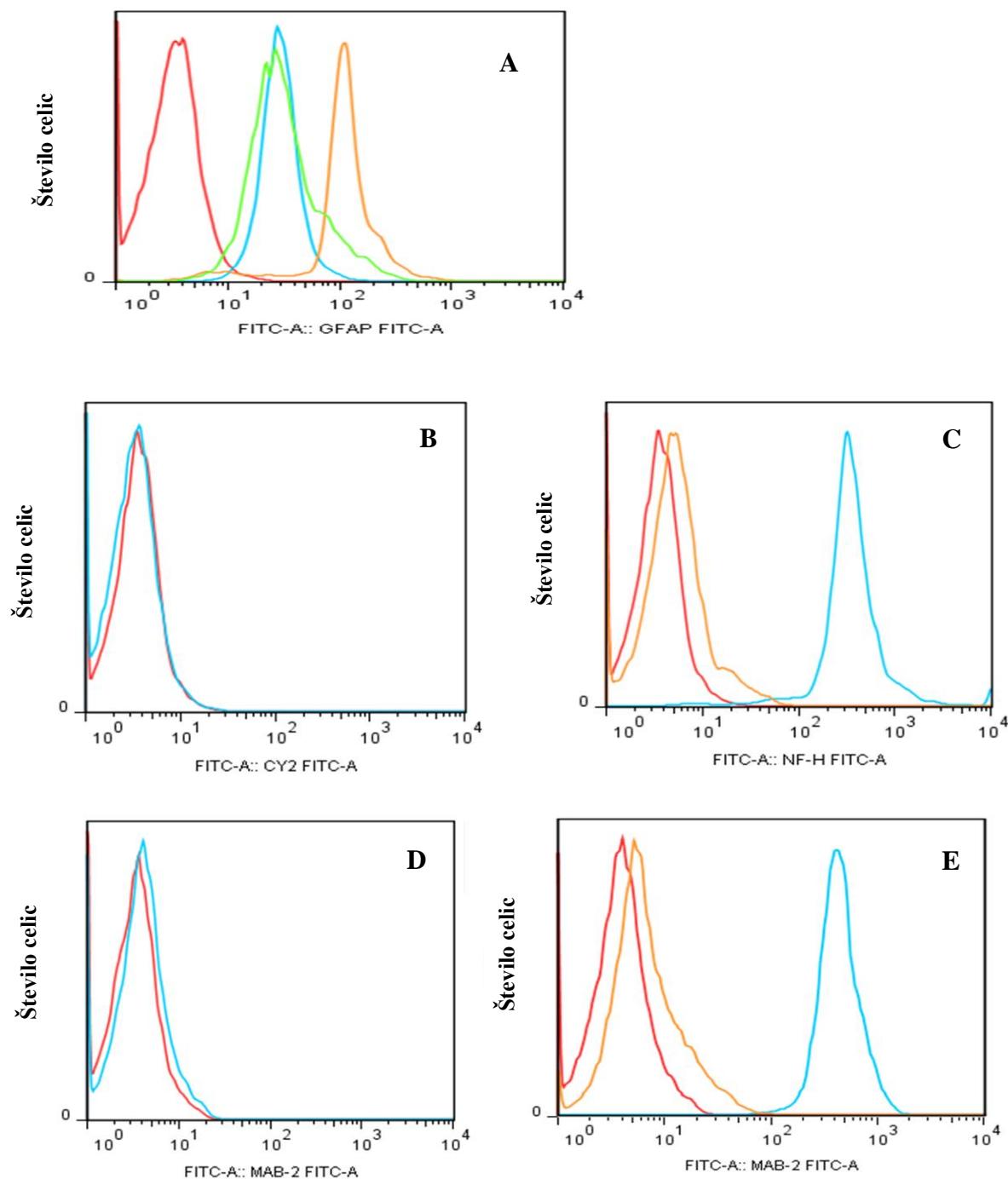
protiteles dodali raztopino za blokiranje nespecifičnih epitopov, pri drugi pa smo uporabili primarna in namesto sekundarnih smo dodali raztopino za blokiranje nespecifičnih epitopov.

S pomočjo točkovnih diagramov, ki jih izpisuje programska oprema (FACSDiva Version 6.1.2) pretočnega citometra smo določili območje celične populacije glede na velikost in zrnatost. Mezenhimske matične celice so po velikosti podobne limfocitom, poleg tega smo pridobili izkušnje v predhodnem delu poskusa za postavitev meja (FSC-A, SSC-A subset) za našo novo populacijo transdiferenciranih celic (**Slika 29**). Glede na meritve negativne kontrole iz celotne populacije smo omejili pozitivne celice za določen označevalec od negativne celice za isti označevalec. Izrisali smo histograme v programu FlowJo za vsak izmerjen celični označevalec pri nediferenciranih MMC, 3 dni in 9 dni po transdiferenciaciji MMC (**Slika 30**).

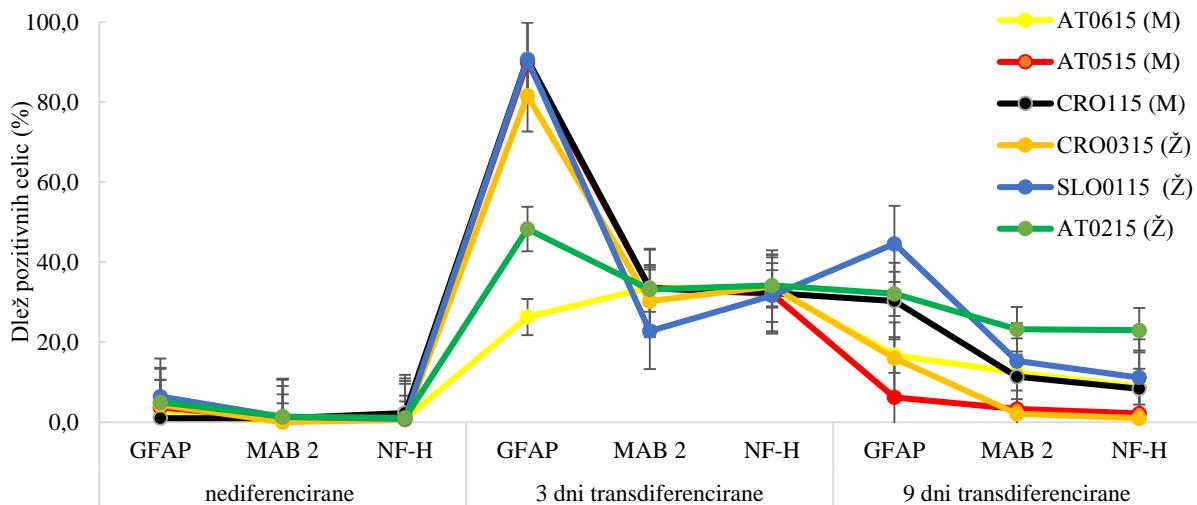


Slika 29: Primer točkovnih diagramov pri karakterizaciji MMC s pretočno citometrijo za celični označevalec GFAP glede na velikost in zrnatost. A: nediferencirane MMC celice, ki ne izražajo GFAP B: tri dni transdiferencirane celice, ki so pozitivne za celični označevalec GFAP. Kratice FSC in SSC so obrazložene v poglavju 3.2.12.

Pri obdelavi rezultatov smo delež pozitivnih celic (%) za posamezni označevalec odšteli od njegove negativne kontrole ter se na tak način znebili nespecifičnih vezav oziroma signalov, izmerjenih na pretočnemu citometru. Za vsako žival smo izrisali graf, pri katerem smo prikazali čas poteka transdiferenciacije v odvisnosti od deleža pozitivnih celic za vsak označevalec. Čeprav so psi, vključeni v poskus, različnega spola, pasme in starosti, smo ugotovili, da je izražanje celičnih označevalcev približno enako pri vseh živalih. Izračunali smo standardno deviacijo pri 95 % intervala zaupanja za vse živali skupaj, tako da smo jih uvrstili v skupine glede na točke transdiferenciacije in izraženost celičnih označevalcev.



Slika 30: Primer histogramov za karakterizacijo transdiferenciranih MMC z celičnimi označevalci GFAP, NF-F in MAP2. **A:** Histogram izražanja GFAP, rdeča - nedif. MMC in neoznačene MMC, oranžna - GFAP+ MMC po 3 dneh transdif., modra - nedif. MMC sek. kontrola po 9 dneh transdif., zelena - GFAP+ MMC po 9 dneh transdif.; **B:** Histogram negativne kontrole za NF-H, modra - nedif. in neoznačene MMC, rdeča - nedif. MMC sek. kontrola po 3 dneh transdif.; **C:** Histogram izražanja NF-H, rdeča - nedif. MMC sek. kontrola po 9 dneh transdif., oranžna - NF-H+ MMC po 9 dneh transdif., modra - NF-H+ MMC po 3 dneh transdif.; **D:** Histogram negativne kontrole za MAP2, modra - nedif. in neoznačene MMC, rdeča - nedif. MMC sek. kontrola po 3 dneh transdif. **E:** Histogram izražanja MAP2, rdeča - nedif. MMC sek. kontrola po 9 dneh transdif., oranžna - NF-H+ MMC po 9 dneh transdif., modra - NF-H+ MMC po 3 dneh transdif.



Slika 31: Delež pozitivnih celic (%) za GFAP, MAP2 in NF-H v treh časovnih točkah za vseh šest živali. Oznaka M pomeni moški spol, Ž pomeni ženski spol.

Standardna deviacija za nediferencirane: GFAP $\pm 2\%$, MAP2 $\pm 0,6\%$, NF-H $\pm 0,6\%$; za 3 dni transdiferencirane: GFAP $\pm 27,4\%$, MAP2 $\pm 4,3\%$, NF-H $\pm 1,1\%$; za 9 dni transdiferencirane: GFAP $\pm 13,8\%$, MAP2 $\pm 7,9\%$, NF-H $\pm 7,9\%$.

V Prilogi E so prikazani rezultati o deležih pozitivnih celic za vsako žival posebej. Podatkom, pridobljenih iz dveh meritev, smo izračunali geometrijsko sredino ter jih nato združili v skupine glede na spol, iz katerih smo osamili MMC.

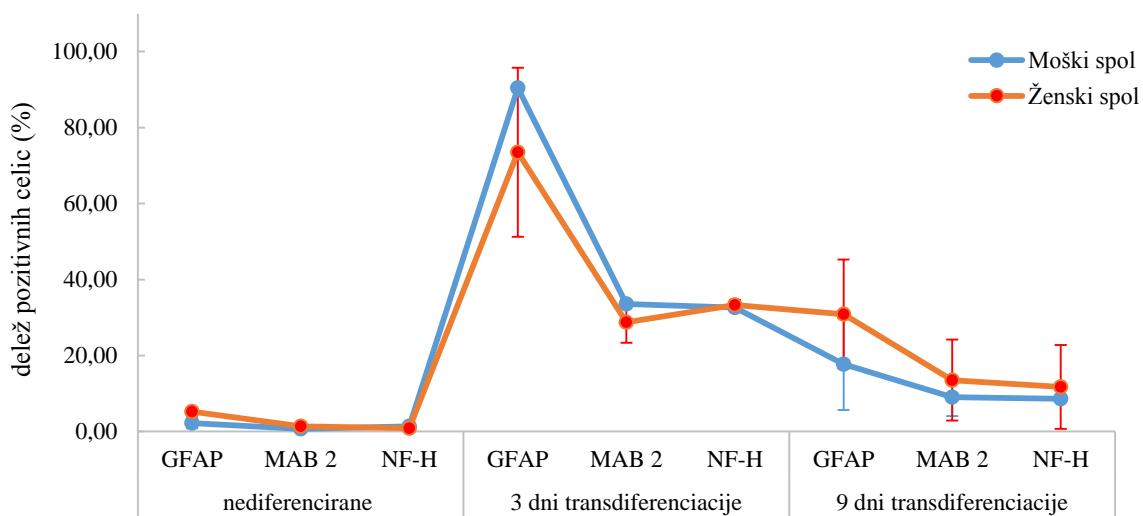
S pomočjo Thompson Tau koeficiente (za tri meritve) smo določili potencialne tehnične osamelce in jih odstranili. Nato smo preračunali povprečje, 1x standardno deviacijo pri 95 % intervala zaupanja in dvakratno standardno deviacijo pri 99 % intervala zaupanja treh živali istega spola za vsak označevalec posebej (**Slika 32**).

Analize na pretočnem citometru so pokazale, da se celični označevalci skozi transdiferenciacijo MMC spreminja, ne glede na to, iz katerega spola smo MMC osamili. Izračunana standardna deviacija je pričakovana, saj smo delali z živim biološkim materialom.

Preglednica 14: Primer izločanja tehničnih osamelcev s pomočjo Thompson Tau koeficiente za tri tehnične meritve nediferenciranih MMC, GFAP (-) celic.

3 teh.pon.	Statistični parametri	Tau vrednost krat StDev (vzorca)	$ X_i - \bar{X}_{povprečje} $	Osamelec test
0,1	Povprečje	0,933333	0,881080	0,883333 OSAMELEC
1,4	StDev (vzorec)	0,765398		0,416667
1,4	Tau vrednost	1,151141		0,466667

Delež pozitivno označenih celic pri nediferenciranih MMC moškega spola so naslednji: GFAP $2,3 \pm 1,4\%$, MAP2 $0,7 \pm 0,4\%$, NF-H $1,4 \pm 0,8\%$, nediferenciranih MMC ženskega spola: GFAP $5,3 \pm 1,1\%$, MAP2 $1,4\%$, NF-H $0,9 \pm 0,3\%$, 3 dni transdiferencirane MMC moškega spola: GFAP $90,4 \pm 0,6\%$, MAP2 $33,6 \pm 0,1\%$, NF-H $32,6 \pm 0,8\%$, 3 dni transdiferencirane MMC ženskega spola: GFAP $73,5 \pm 22,3\%$, MAP2 $22,8 \pm 5,4\%$, NF-H $33,3 \pm 1,4\%$, 9 dni transdiferencirane MMC moškega spola: GFAP $17,8 \pm 12,1\%$, MAP2 $9,0 \pm 5\%$, NF-H $8,7 \pm 0,4\%$, 9 dni transdiferencirane MMC ženskega spola: GFAP $30,9 \pm 14,3\%$, MAP2 $13,6 \pm 10,7\%$, NF-H $11,7 \pm 11,0\%$.



Slika 32: Delež pozitivnih celic (%) za GFAP, MAP2 in NF-H v treh časovnih točkah za moški in ženski spol.

5 RAZPRAVA

Nevrodegenerativne bolezni povzročajo resne težave predvsem v bolj razvitih državah, ker se število ostarelega prebivalstva vsako leto povečuje. Ena od novih rešitev za zdravljenje teh bolezni je uporaba matičnih celic s pomočjo regenerativne medicine. Zagotovo predstavlja uporaba mezenhimskih matičnih celic iz maščobnega tkiva pomemben obetajoč dejavnik za prihodnost modeliranja nevrodegenerativnih bolezni, kot tudi postavitev biološko-farmacevtske platforme za iskanje novih zdravil. Do danes je v strokovni literaturi kar nekaj znanstvenih objav o sposobnostih transdiferenciacije mezenhimskih matičnih celic, osamljenih iz maščobnega tkiva človeka, v celice živčnega sistema (Ahmadi in sod., 2012; Ashjian in sod., 2003; Neuhuber in sod., 2004; Rodriguez in sod., 2005; Safford in sod., 2002; Tomita in sod., 2013; Yu in sod., 2011). Kljub temu, da veliko mehanizmov o poteku procesa transdiferenciacije ni znanih (Sisakhtnezhad in Matin, 2012), še vedno ni jasna njihova uporabnost na dolgi rok. Nekateri znanstveniki dvomijo v sposobnosti transdiferenciacije MMC v živčne ali oporne celic živčnega sistema. Izvedena je bila raziskava, pri kateri so pokazali, da so morfološke spremembe transdiferencirane MMC posledica citoplazmatskih sprememb, ki jih povzroča depolarizacija F-aktina zaradi stresa, ki ga povzročajo kemijski dejavniki v gojišču in ne razširitev novih mikrotobularnih elementov novo nastalih celic (Neuhuber in sod., 2004). Zato ima veterinarska medicina veliko prednost pri vključevanju živali v podobne raziskave predvsem zaradi bolj sprejemljive zakonodaje (de Bakker in sod., 2014). Pes se je izkazal kot najbolj primerni model v predkliničnih študijah, saj je morfološko zelo podoben človeku (Smith, 2008). Predkliničnih študij o uporabi transdiferenciranih pasjih MMC v celice živčnega sistema v literaturi nismo zasledili, zato naše raziskovalno delo predstavlja le en del mozaika o zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni in ostalih poškodb živčnega sistema ter ponuja možnost o prenosu podobnih terapij na človeka.

Pri transdiferenciaciji so MMC izpostavljene stresnim dejavnikom, ki povzročajo preureditev znotraj citoplazme. Naš cilj je bil spremeniti MMC (en celični tip) v celice živčnega sistema (drugi celični tip) tako, da smo dodali signalne molekule in rastne dejavnike, ki povzročajo spremembe znotraj delitvenega cikla celic. Po osamitvi MMC iz maščobnega tkiva nismo imeli popolnoma čiste kulture MMC, saj je vsebovala tudi veliko fibroblastov in nekaj limfocitov, ki imajo podobno velikost kot MMC (Zuk in sod., 2001). Po pregledu veliko strokovne literature, ki opisuje sestavne elemente gojišča, s katerim transdiferencirajo MMC v živčne celice, smo seznam teh gojišč prikazali v **preglednici 3**. Večina raziskovalnih skupin uporablja podobne kemikalije (npr. BHA, DMSO, BME, valproična kislina, forskolin, hidrokortizol, inzulin) in prepisovalne dejavnike (npr. BDNF, bFGF, bEGF) v kombinaciji s kemijskimi molekulami, ki vplivajo na regulacijo in spremenjanje znotraj delitvenega cikla celic (Kim in sod., 2014; Chung in sod., 2013; Neupane in sod., 2008; Kamishina in sod., 2006,).

V začetku smo poskušali prilagoditi že obstoječe postopke za transdiferenciacijo MMC iz maščobnega tkiva psa, vendar poskusi niso bili uspešni (Neuhuber et al., 2004; Woodbury in sod., 2000; Zemelko et al., 2013). Prvič, imeli smo težave z nasaditveno gostoto celic v gojitvenih posodicah, saj smo upoštevali nasaditveno gostoto $0,5 \times 10^4$ celic/cm², kot so opisali Sago in sod. (2007) za transdiferenciacijo MMC osamljenih iz maščobnega tkiva psa. Drugič, nismo mogli fiksirati celic na krovna stekelca, prevlečena s poli-L-lizinom, kot so opisali Lim in sod. (2010). Tretjič, nismo mogli zagotoviti ustrezne viabilnosti (vsaj 90 % viabilnosti) po tri dnevnem tretiranju v diferenciacijskemu gojišču, ki je vsebovalo 2 % DMSO, 200 mM BHA, 1 mM BME (Woodbury in sod., 2000). Preizkusili smo tudi drugo gojišče, ki je vsebovalo 200 µM BHA; 5 mM KCL; 2 mM valproične kislino; 10 µM forskolina; 1 µM hidrokortizola in 5 µg/mL inzulina (Park in sod., 2012; Safford in sod., 2002), vendar ponovno nismo bili uspešni.

Dodatno strokovno znanje smo pridobili med študijsko praksjo (podprto s strani Norveškega sklada za razvoj kadrov) na oddelku za nevrofiziologijo (Medicinska fakulteta na Univerzi v Oslu) pod vodstvom prof. dr. Joela Gloverja, kjer smo tudi izvedli poskuse za magistrsko delo. Glede na njihove dolgoletne izkušnje s transdiferenciacijo embrionalnih matičnih celic v živčne celice so predlagali posredni pristop transdiferenciacije MMC z rastnimi dejavniki ob tretiranju v pre-diferencijskem gojišču STIM1 ter nadaljno transdiferenciacijo v gojišču NIM (**Preglednica 6**). Osredotočili smo se na postopke nevrotransdiferenciacije, ki vsebujejo kombinacijo bazičnega fibroblastnega dejavnika bFGF in bazičnega epidermalnega rastnega dejavnika bEGF, pri čemer nastanejo vmesne nevrosferne celične oblike. Nato smo celice dodatno tretirali z nevrotvornim dejavnikom (N2), B27 dodatkom v kombinaciji z retinojsko kislino (Anghileri in sod., 2008; Razavi in sod., 2013; Zemelko in sod., 2013). Spremenili smo tudi nasaditveno gostoto 10000 celic/cm² (Park in sod., 2012) v T-25 cm² gojitvenih posodicah in upoštevali priporočila raziskovalne skupine prof. dr. Joela Gloverja (Boulland et al., 2013). Uporabili smo nasaditveno gostoto 100000 celic/cm² v T-25-cm² gojitvenih posodicah za nevrotransdiferenciacijo. Posebnost v naši raziskavi je testiranje različnih koncentracij retinojske kislino (10 nM, 100nM in 10 µM), dodane v diferenciacijsko gojišče. V literaturi večinoma uporabljajo 100 nM retinojske kislino (Tong in sod., 2010), vendar kako so prišli do te koncentracije, ni opisano. Že po prvem poskusu smo opazili prve morfološke spremembe: vretenaste celične oblike in sorazmerno velika jedra v primerjavi s citoplazmo, kot jih opisujejo tudi Kim in sod. (2014). Dodatno smo preučevali vpliv različnih koncentracij retinojske kislino s pomočjo spremeljanja viabilnosti MMC, kar nam je dalo vedeti, kako različne koncentracije retinojske kislino v gojišču vplivajo na pasje MMC v celični kulturi. Opazili smo tudi morfološke razlike med različnimi koncentracijami retinojske kislino v celični kulturi, opisano v **poglavlju 4.1**. Želeli smo potrditi mofrološke spremembe, ki spominjajo na celice živčnega sistema s pomočjo imunobarvanja, pri čemer smo izbrali specifične živčne celične označevalce, opisane v **preglednici 9 in preglednici 10**. Po izvedeni imunohistokemiji na pasjih možganskih rezinah smo določili, da so za izbrana živčna označevalca najbolj primerna kunčja protitelesa

proti GFAP, MAP2 in NF-H. Ko smo izbrali primerna protitelesa za določanje celičnih označevalcev, smo izvedli imunocitokemijo MMC, ki smo jih nasadili na okrogla krovna stekelca, prevlečena z Lamininom. Zamenjava poly-L-lizina z lamininom je bistveno pripomogla, da smo celice bolj uspešno pritrđili na okrogla krovna stekelca, pri tem da so se celice nemoteno namnoževale. Laminin se največkrat uporablja za pritrjevanje živčnih celic na krovna stekelca za metodo imunobarvanja.

Pokazali smo, da se celični označevalec GFAP za glija celice izraža po treh dneh transdiferenciacije v NIM gojišču (pri 10 nM in 100 nM koncentracijah retinojske kisline). Po devetih dneh tretiranja v NIMa gojišču se zgodba nekoliko spremeni, saj signala za GFAP nismo več zaznali. Zaznali smo znotraj celična filamentna označevalca NF-H in MAP2, specifična za odrasle živčne celice. Dejansko odrasle živčne celice rastejo na opornih celicah živčnega sistema, zato je večja nasaditvena gostota MMC v gojitveni posodici pripomogla k uspešnejši transdiferenciaciji MMC v živčne celice. Podobne ugotovitve so objavile tudi druge raziskovalne skupine (Park in sod., 2012; Zuk in sod., 2002; Lim in sod., 2010; Safford in sod., 2004). Odločili smo, da je gojišče NIMa (10 nM retinojska kislina) najbolj primerno za transdiferenciacijo v oporne (glija) in odrasle živčne celice (nevrone) na osnovi viabilnosti in izražanja celičnih označevalcev. Pri tej koncentraciji so celice po devetih dneh transdiferenciacije dosegle 90 % viabilnost. Pri 10 µM koncentracije retinojske kisline so celice po devetih dneh transdiferenciacije dosegle le 60 % viabilnost. Poleg tega smo pri spremeljanju mofroloških sprememb zaznali veliko prisotnost apoptočnih celic, razširjeno citoplazmo, kjer se vidijo zrnate celične organele. Zato smo sklepali, da visoka koncentracija retinojske kisline vpliva toksično na celice. Aktivirajo se druge metabolne poti, ki vodijo k hitremu namnoževanju celic, tako da privedejo do mutacije in na koncu do propada celic.

Nato smo isti poskus ponovili v centru za genomiko živali na Veterinarski fakulteti v sodelovanju s podjetjem Animacel in osamljene mezenhimske matične celice iz maščobnega tkiva psa uspešno transdiferencirali v celice živčnega sistema (glija in nevroni). Uporabili smo osamljene MMC iz maščobnega tkiva šestih pasjih pacientov (tri psice in trije psi, vsi stari med 2 in 9 leti) podjetja Animacel, katerih lastniki so podpisali pisno soglasje za uporabo shranjenih matičnih celic v raziskavi. Uspešno transdiferencirane MMC smo karakterizirali s pomočjo celičnih označevalcev značilnih za celice živčnega sistema: GFAP, MAP2 in NF-H. Spremljali smo morfološke spremembe MMC v celični kulturi in viabilnosti celic skozi čas transdiferenciacije. Uporabili smo metode imunobarvanja z namenom kvalitativnega spremeljanja celičnih označevalcev s pomočjo flurescenčne in konfokalne mikroskopije ter pretočno citometrijo za kvantitativno določanje specifičnih označevalcev, ki so prisotni med procesom transdiferenciacije.

5.1 KARAKTERIZACIJA TRANSDIFERENCIRANIH PASJIH MMC

Prve morfološke spremembe smo opazili po 48 urah tretiranja MMC v STIM1 gojišču, ki vsebuje rastne dejavnike EGF in FGF. Potrdili smo tvorbo nevrosfernih oblik, ki nastanejo ob prisotnosti teh dveh rastnih dejavnikov v gojišču (Lim in sod., 2010). Po 3 dneh transdiferenciacije se je število nevrosfer bistveno povečalo ob tretiraju v NIMa gojišču. Poleg tega smo opazili sferno - vretenaste oblike z velikimi jedri in stranskimi podaljški, ki spominjajo na oporne celice živčnega sistema. Po šestih dneh smo opazili bistvene morfološke spremembe, saj so se sferno - vretenaste oblike spremenile v zvezdaste oblike z veliko izrastki, ki se prepletajo med seboj (**slika 19**). Transdiferencirane celice živčnega sistema so po velikosti med 30 µm in 60 µm. Tudi druge znanstvene objave potrjujejo podobne morfološke spremembe, kot smo jih ugotovili sami (Anghileri et al., 2008; Park in sod., 2012; Safford in sod., 2002). Pri optimizaciji in iskanju ustreznega gojišča smo opazili, da je bila nasaditvena gostota MMC v gojitvenih posodicah zelo pomembna, zaradi boljše nevrotransdiferenciacije v odraslih živčnih celicah. Zato smo se odločili, da osamljene MMC iz maščobnega tkiva najprej nasadimo v gojilne posodice za 24 ur in jih nato namnožimo v Animacel gojišču. Šele po doseženi 80 % konfluentnosti nadaljujemo s transdiferenciacijo v NIMa gojišču. Poleg dodanih rastnih dejavnikov imajo mezenhimske matične celice sposobnost izločanja drugih citokinov, ki povečajo komunikacijo med celicami v kulturi (Caplan in Dennis 2006).

S pomočjo štetja celic pri vsaki točki transdiferenciacije za posamezno žival, smo žeeli pridobiti tri pomembne informacije: 1. ali število celic upada ob tretiraju MMC v diferenciacijskem gojišču NIMa; 2. kakšna je viabilnost, ki nam daje informacije o toksičnem vplivu gojišča na celice in njihovo sposobnost preživetja med transdiferenciacijo (meritve v treh točkah: nediferencirane, 3 dni in 9 dni po transdiferenciaciji) 3. ali opazimo razliko med rastjo moških in ženskih MMC med transdiferenciacijo. Ugotovili smo veliko variacijo v populaciji med pridobljenimi rezultati o številu celic in njihovimi viabilnostmi v posamezni točki transdiferenciacije, tudi med istimi spoli. Čeprav rezultati nakazujejo, da se celična koncentracija po treh dneh transdiferenciacije poveča približno trikrat in po devetih dneh pade približno dvakrat pri vseh živalih, statistika govori nasprotno. Pridobljeni podatki niso statistično značilni ($p > 0,05$) pri 95 % intervala zaupanja, pri vseh točkah transdiferenciacije. Zato nismo mogli primerjati celične rasti transdiferenciranih MMC glede na spol. Rezultati so pričakovani, saj so vsi psi vključeni v poskus različne starosti ter izhajajo iz različnih pasem. Standardna deviacija nakazuje, da so za uspešnost transdiferenciacije pomembni drugi dejavniki. Zavedati se moramo, da je transdiferenciacija naključni proces, ki naključno povzroča spremembe znotraj delitvenega cikla celic. Retinojska kislina ima sposobnost aktivacije post-mitotičnega, nevralnega fenotipa *in vitro* v različnih matičnih celicah, kar potrjuje teorijo o njenem sodelovanju pri preklopu med namnoževanjem in diferenciacijo celic (Kim in sod., 2002; Sanchez-Ramos in sod., 2000). Poleg tega še vedno ne poznamo natančnega mehanizma transdiferenciacije MMC na splošno.

Rezultati viabilnosti so pokazali statistično značilne rezultate ($p < 0,05$), opazili smo padec iz 97 % na 93 % pri moškemu spolu in iz 99 % na 83 % pri ženskemu spolu po devetih dneh transdiferenciacije MMC v živčne celice. Podobne ugotovitve, vendar ne glede na spol, iz katerega izhajajo MMC, je pokazala raziskovalna skupina Safford in sod. (2004), kjer so opazili 35 % viabilnost celic po petdnevnom tretiranju v nevralnem gojišču. Po štirinajstih dneh so MMC popolnoma umrle. Nedvomno so MMC iz maščobnega tkiva pokazale namnoževalni potencial, čeprav so v diferencijskem gojišču komponente, ki preusmerjajo in kontrolirajo celično delitev. Ni raziskano ali je padec viabilnosti celic povezan z apoptozo, celično nekrozo ali pa kombinacija teh dveh mehanizmov.

Oporne celice živčnega sistema imajo zvezdaste, razvezjane oblike, ki tesno sodelujejo z živčnim celicam in pomagajo pri njihovemu delovanju. Celični označevalci GFAP je fibrilarni protein astrocitov, ki smo ga zasledili v celični kulturi po treh dneh transdiferenciacije v NIMa gojišču. Po devetih dneh transdiferenciacije v NIMa gojišču signala za GFAP z metodo imunobarvanja pri vseh šestih živalih nismo več zasledili. Razlog bi lahko bil v majhnem številu celic, ki so ostale pritrjene na lamininski podlagi v gojitenih posodicah. Posledično celična komunikacija ni bila omogočena, zato celice niso nadaljevale s procesom transdiferenciacije. Iz druge strani pa lahko rečemo, da so oporne celice živčnega sistema opravile svojo nalogo in omogočile razvoj odraslim živčnim celicam. Izražanje GFAP proteina se je utišalo in začeli so se izražati proteini, značilni za odrasle živčne celice, ki smo jih po devetih dneh transdiferenciacije zaznali z metodo imunobarvanja. Pri nediferenciranih MMC smo po treh dneh transdiferenciacije v NIMa gojišču z metodo imunobarvanja opazili slab signal izražanja GFAP podobno, kot so pokazali Jang in sod. (2010). Razloga za slab signal nediferenciranih celic nismo dodatno raziskali. Izključili smo možnost nespecifične vezave celičnega označevalca GFAP, ker ima monoklonsko protitelo zelo specifično vezavo na antigen. Jang in sod. (2010) so opisali, da gre v primeru, ko zaznamo signal enega celičnega označevalca, za določitev naravne sposobnosti transdiferenciacije MMC iz maščobnega tkiva v oporne celice živčnega sistema. Poleg tega druge raziskovalne skupine opisujejo, da nediferencirane MMC izražajo različne predniške celične označevalce podobno, kot je znano za ostale matične in predniške celične populacije (Ramos in sod., 2002; Sond in sod., 2001; Woodbury in sod., 2000). Z dokazovanjem prisotnosti beljakovine NF-H in MAP2 v časovnih točkah po izpostavitvi pogojem za transdiferenciacijo smo dokazali, da smo MMC transdiferencirali tudi v odraslih živčnih celicah. Pokazali smo njihovo izražanje s pomočjo imunobarvanja po treh in devetih dneh transdiferenciacije v NIMa gojišču pri obeh spolih (Safford in sod. 2004; Park in sod., 2012).

Analize na pretočnem citometru so pokazale, da se celični označevalci skozi transdiferenciacijo MMC spreminjajo ne glede na to, iz katerega spola smo MMC osamili. Izračunana standardna deviacija je pričakovana, saj smo delali z živim biološkim materialom. Potrdili smo teorijo, da oporne celice živčnega sistema spodbujajo rast in

delovanje živčnih celic, saj smo po 3 dneh transdiferenciacije pričakovano zaznali njihovo izražanje. S časom je GFAP iz $90,4 \pm 0,6\%$ (3 dni transdiferenciacije) padel na $17,8 \pm 12,1\%$ (9 dni transdiferenciacije) pri moškemu spolu, in iz $73,5 \pm 22,3\%$ (3 dni transdiferenciacije) padel na $30,9 \pm 14,3\%$ (9 dni transdiferenciacije) pri ženskemu spolu. Podobne rezultate so objavili tudi Safford in sod. (2002) in Safford in sod. (2004), da se GFAP po 24 urah izraža v $87,6 \pm 5,6\%$. Opazili smo tudi pozitivno izražanje celičnih označevalcev za MAP2 ($33,6 \pm 0,1\%$ moškega spola in $22,8 \pm 5,4\%$ ženskega spola) in NF-H ($32,6 \pm 0,8\%$ moškega spola in $33,3 \pm 1,4\%$ ženskega spola) po treh dneh transdiferenciacije, vendar se njihovo izražanje bistveno ne spreminja tudi po devetih dneh transdiferenciacije za MAP2 ($9,5 \pm 5\%$ moškega spola in $13,6 \pm 10,7\%$ ženskega spola) in NF-H ($8,7 \pm 0,4\%$, moškega spola in $11,7 \pm 11,0\%$ ženskega spola), tako pri ženskem kot pri moškem spolu. Iz rezultatov ne moremo določiti razlike med transdiferenciacijo moškim in ženskim MMC, med različnimi točkami tretiranja z diferencijskim gojiščem NIMa.

Z našo raziskavo smo potrdili, da so se mezenhimske matične celice iz maščobnega tkiva psa sposobne transdiferencirati v celice živčnega sistema, tako oporne kot odrasle živčne celice.

6 SKLEPI

Potrdili smo možnost transdiferenciacije mezenhimskim matičnih celic, osamljenih iz maščobnega tkiva psa, v celice živčnega sistema. Pokazali smo pozitivno izražanje celičnih označevalcev, tako za oporne živčne celice (astro, glija) kot tudi za živčne celice (nevroni).

Celična gostota v gojitvenih posodicah igra pomembno vlogo pri procesu transdiferenciacije. Čim bolj je gosto nasajena populacija MMC v gojitvenih posodicah, tem boljše sodelovanje je med celicami na tak način, da začnejo izločati dodatne neznane molekule, ki pomagajo pri transdiferenciaciji MMC v celice živčnega sistema.

Koncentracija retinojske kisline je kot pomembni dejavnik v gojišču za transdiferenciacijo ključnega pomena za transdiferenciacijo MMC v celice živčnega sistema. Visoka koncentracija retinojske kisline, kot je $100 \mu\text{M}$, lahko vpliva toksično na celice, celična viabilnost pada in ni dobrega komuniciranja med celicami.

Ob časovnem spremeljanju procesa transdiferenciacije s pomočjo celičnih označevalcev smo opazili tri ključne parametre. Prvič, delež izražanja GFAP pozitivnih celic se je najprej izrazito povečal (po 3 dneh transdiferenciacije) ter nato padel za skoraj 50 % (po 9 dneh transdiferenciacije). Drugič, delež izražanja MAP2 in NF-H je stalen pri vseh testiranih živalih med 3 in 9 dnevno transdiferenciacijo v NIMa gojišču. Tretjič, opazili smo slab pozitivni signal izražanja GFAP pri nediferenciranih MMC po 3 dneh gojenja celic v navadnemu rastnemu mediju, za katerega domnevamo, da imajo MMC, osamljene iz maščobnega tkiva psa, naravno sposobnost transdiferenciacije v živčne celice.

Spolne razlike med osamljenimi celicami med karakterizacijo transdiferenciranih celic nismo opazili. Zelo majhno razliko sposobnosti boljše transdiferenciacije z manjšo standardno deviacijo med ponovitvami kažejo celice, osamljene iz moškega spola. Pri osamljenih MMC ženskega spola opažamo pri vseh poskusih transdiferenciacije slabšo celično rast, čeprav smo začeli iz iste celične pasaže. Slabšo transdiferenciacijo prepisujemo njihovi slabši celični rasti.

7 POVZETEK

Mezenhimske matične celice imajo veliko prednosti predvsem zaradi odsotnosti etičnih zadržkov, številnih virov tkiv, iz katerih jih lahko osamimo, nizke imunogenosti, ne prihaja do nastankov teratomov, kar jih uvršča med najbolj zaželene celice v kliničnih študijah. Maščobno tkivo predstavlja ogromen in enostavno dostopen vir mezenhimskih matičnih celic. Postopek odvzema koščkov maščobnega tkiva iz psa poteka na zelo neinvaziven način, z liposukcijo, biopsijo ali manjšim kirurškim posegom v lokalni anesteziji. Leta 2008 so prvič objavili prilagojen postopek osamitve MMC iz maščobnega tkiva psa in pokazali njihovo sposobnost pritrjevanja na plastične gojitvene posodice. Pasje mezenhimske matične celice (MMC), osamljene iz maščobnega tkiva, se vedno bolj uporabljajo v bazičnih raziskavah transdiferenciacije MMC v živčne celice in/ali oporne celice živčnega sistema. Proces transdiferenciacije matičnih celic iz maščobnega tkiva je tesno povezan s celičnim reprogramiranjem, ki omogoča spremembe znotraj delitvenega cikla celic. Možnost transdiferenciacije MMC v celice živčnega sistema je zelo pomembna za razvoj nadaljnjih terapij zdravljenja poškodb centralnega živčnega sistema z matičnimi celicami iz maščobe. V tem primeru bi zdravljenje psov s poškodbami centralnega živčnega sistema ali z nevrodegenerativnimi boleznimi lahko pripomoglo tudi k hitrejšemu razvoju zdravljenja takšnih težav pri ljudeh.

Med raziskovalnim delom smo največ časa porabili za optimizacijo protokolov in ustreznih komponent diferenciacijskih gojišč za uspešno transdiferenciacijo MMC v živčne celice. Testirali smo 3 pred-diferenciacijska gojišča in 6 diferenciacijskih gojišč, da smo na koncu izbrali pre-diferenciacijsko STIM1 in diferenciacijsko NIMA gojišče. Gojišče STIM1 vsebuje rastne dejavnike EGF, bFGF in B27, medtem ko NIMA vsebuje B27, N2 dodatka, FBS, antibiotik in 10 nM retinojsko kislino.

Ključna parameterja za uspešno transdiferenciacijo MMC v živčnih celicah sta dovolj veliko število celic v gojitveni posodici in ustrezna koncentracija retinojske kisline v gojišču. Ob takšnih pogojih smo uspešno transdiferencirali pasje MMC, osamljene iz maščobnega tkiva.

Transdiferencirane celice smo karakterizirali s pomočjo imunobarvanja in pretočne citometrije. Celični označevalec GFAP je fibrilarni protein astrocitov, ki smo ga zasledili v celični kulturi po 3 dneh transdiferenciacije v NIMA gojišču. Po 9 dneh transdiferenciacije v gojišču NIMA pa se je signal za GFAP znižal za skoraj 50 %. Z dokazovanjem prisotnosti celičnih označevalcev NF-H in MAP2 v časovnih točkah po izpostavitvi pogojem za transdiferenciacijo smo dokazali, da smo MMC transdiferencirali tudi v odraslih živčnih celicah in njihov delež pozitivnih celic se je gibal med 15 % in 30 %, tako pri moških kot pri ženskih celicah. Bistvene razlike v uspešnosti transdiferenciacije med spoloma, iz katerih smo osamili MMC, nismo opazili.

8 VIRI

- Adams A. M., Arruda E. M., Larkin L. M. 2012. Use of adipose-derived stem cells to fabricate scaffoldless tissue-engineered neural conduits in vitro. *Neuroscience*, 201: 349–356
- Aggarwal S., Pittenger M. F. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105, 4: 1815–1822
- Al Tanoury Z., Gaouar S., Piskunov A., Ye T., Urban S., Jost B., Rochette-Egly C. 2014. Phosphorylation of the retinoic acid receptor RAR γ 2 is crucial for the neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, 127: 2095–2105
- Anghileri E., Marconi S., Pignatelli A., Cifelli P., Galié M., Sbarbati A., Bonetti B. 2008. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 17, 5: 909–916
- Aruga J., Mikoshiba K. 2011. Role of BMP, FGF, calcium signaling, and zic proteins in vertebrate neuroectodermal differentiation. *Neurochemical Research*, 36, 7: 1286–1292
- Ashjian P. H., Elbarbary A. S., Edmonds B., De Ugarte D., Zhu M., Zuk P., Hedrick M. H. 2003. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 111: 1922–1931
- Bailey A. M., Kapur S., Katz A. J. 2010. Characterization of adipose-derived stem cells: an update. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 5, 2: 95–102
- Bakke A. C. 2001. The principles of flow cytometry. *Laboratory Medicine*, 32, 4: 207–211
- Barber T., Esteban-Pretel G., Martin M. P., Timoneda J. 2014. Vitamin A deficiency and alterations in the extracellular matrix. *Nutrients*, 6, 11: 4984–5017
- Bastidas O., Quesada J. 2014. Cell counting with Neubauer chamber - basic hemocytometer usage. Celeromics, 1: 6 str.
<http://www.celeromics.com/cell-counting> (15. maj 2016)
- Belicchi M., Pisati F., Lopa R., Porretti L., Fortunato F., Sironi M., Torrente Y. 2004. Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *Journal of Neuroscience Research*, 77, 4: 475–486
- Bianco P., Robey P. G., Simmons P. J. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts and assays. *Cell Stem Cell*, 2, 4: 313–319
- Boulland J. L., Mastrangeliopoulos M., Boquest A. C., Jakobsen R., Noer A., Glover J. C., Collas P. 2013. Epigenetic regulation of nestin expression during neurogenic differentiation of adipose tissue stem cells. *Stem Cells and Development*, 22, 7: 1042–1052

- Caplan A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 9, 5: 641–650
- Caplan A. I., Dennis J. E. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98, 5: 1076-1084
- Casteilla L., Planat-Bénard V., Cousin B., Silvestre J. S., Laharrague P., Charrière G., Pénicaud L. 2005. Plasticity of adipose tissue: a promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases? *Archives Des Maladies Du Coeur et Des Vaisseaux*, 98, 9: 922–926
- Chagraoui J., Lepage-Noll A., Anjo A., Uzan G., Charbord P. 2003. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood*, 101, 8: 2973–2982
- Chamak B., Fellous A., Glowinski J., Prochiantz A. 1987. MAP2 expression and neuritic outgrowth and branching are coregulated through region-specific neuro-astroglial interactions. *The Journal of Neuroscience*, 7, 10: 3163–3170
- Chanda D., Kumar S., Ponnazhagan S. 2010. Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111, 2: 249-257
- Chase L. G., Rao M. S. G., Vemuri M. S. 2011. Mesenchymal stem cell assays and applications. V: *Methods in Molecular Biology*. 1st ed. Vemuri M.S., Chase L.G., Lipnick S. New York, Humana Press: 534 str.
- Choi B. H., Kim R. C. 1984. Expression of glial fibrillary acidic protein in immature oligodendroglia. *Science New York*, 223, 4634: 407–409
- Chung C. S., Fujita N., Kawahara N., Yui S., Nam E., Nishimura R. 2013. A comparison of neurosphere differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75, 7: 879–886
- Correlo V. M., Oliveira J. M., Mano J.F., Neves N.M., Reis R. L., 2011. Natural origin materials for bone tissue engineering – properties, processing, and performance. V: *Textbook on Principles of regenerative medicine*. 2nd ed. Atala A., Lanza R., Thomson J. A., Nerem R. Burlington, Elsevier: 1182 str.
- Colman A., Dreesen O. 2009. Pluripotent stem cells and disease modeling. *Cell Stem Cell*, 5, 3: 244–247
- Croft A. P., Przyborski S. A. 2006. Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. *Stem Cells*, 24, 8: 1841–1851
- Csaki C., Matis U., Mobasher A., Ye H., Shakibaei M. 2007. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: A biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochemistry and Cell Biology*, 128, 6: 507–520

- D'Ippolito G., Schiller P. C., Ricordi C., Roos B. A. Howard G. A. 1999. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14, 7: 1115–1122
- de Bakker E., Van Ryssen B., De Schauwer C., Meyer E. 2014. Canine mesenchymal stem cells: state of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man. *The Veterinary Quarterly*, 33, 4: 225–233
- De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F. P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and Rheumatism*, 44, 8: 1928–1942
- Denham M., Conley B., Olsson F., Cole T. J., Mollard R. 2005. Stem Cells : An overview. current protocols in cell biology. doi: 10.1002/0471143030.cb2301s28
- Di Summa P. G., Kingham P. J., Raffoul W., Wiberg M., Terenghi G., Kalbermatten D. F. 2010. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 63, 9: 1544–1552
- Dodson M. V., Hausman G. J., Guan L., Du M., Rasmussen T. P., Poulos S. P., Jiang Z. 2010. Skeletal muscle stem cells from animals I. basic cell biology. *International Journal of Biological Sciences*, 6, 5: 465-474
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 4: 315–317
- Eguchi G., Okada T. S. 1973. Differentiation of lens tissue from the progeny of chick retinal pigment cells cultured in vitro: a demonstration of a switch of cell types in clonal cell culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 5: 1495–1499
- Fei Yin, Chunyang Meng, Rifeng Lu, Lei Li, Ying Zhang, Hao Chen, Yonggang Qin, and Li Guo P. D. 2014. Bone marrow mesenchymal stem cells repair spinal cord ischemia/reperfusion injury by promoting axonal growth and anti-autophagy. *Neural Regeneration Research*, 9, 18: 1665–1671
- Ferroni L., Gardin C., Tocco I., Epis R., Casadei A., Vindigni V., Zavan B. 2013. Potential for neural differentiation of mesenchymal stem cells. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 129, 89–115
- Frey S. K., Vogel S. 2011. Vitamin A metabolism and adipose tissue biology. *Nutrients*, 3, 1: 27–39
- Friedenstein A. J., Chailakhyan R. K., Latsinik N. V., Panasyuk Andrey F., Keiliss-Borok I. V. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17: 331–340

- Friedenstein A. J., Piatetzky-Shapiro I. I., Petrakova. K.V. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal Embryology and Experimental Morphology*, 16, 3: 381–390
- Fulwyler M. J. 1965. Electronic separation of biological cells by volume. *Science*, 150, 3698: 910–911
- Geahlen R. L., Haley B. E. 1977. Interactions of a photoaffinity analog of GTP with the proteins of microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 10: 4375–4377
- Gimble J. M., Katz A. J., Bunnell B. A. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 100, 2: 1249–1260
- Givan A.L. 2011. Flow cytometry: an introduction. *Methods in Molecular Biology*, 699: 1–29
- Glavaski-Joksimovic A., Bohn M. C. 2013. Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 247: 25–38
- Gori G. B. 1964. Trypsinization of animal tissues for cell culture: theoretical considerations and automatic apparatus. *Applied Microbiology*, 12: 115–121
- Green H., Kehinde O. 1974. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell*, 1, 3: 113–116
- Gregoire F. M., Smas C. M., Sul H. S. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews*, 78, 3: 783–809
- Gronthos S., Franklin D. M., Leddy H. A., Robey P. G., Storms R. W., Gimble J. M. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, 189, 1: 54–63
- Gudas L. J., Wagner J. A. 2011. Retinoids regulate stem cell differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 226, 2: 322–330
- Guercio A., Di Marco P., Casella S., Cannella V., Russotto L., Purpari G., Piccione G. 2012. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biology International*, 36, 2: 189–194
- Guilak F., Lott K. E., Awad H. A., Cao Q., Hicok K. C., Fermor B., Gimble J. M. 2006. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 206, 1: 229–237
- Hauner H., Schmid P., Pfeiffer E. F. 1987. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 64, 4: 832–835
- Hausman G. J., Campion D. R. 1982. Histology of the stroma in developing rat subcutaneous adipose tissue. *Journal of Animal Science*, 55, 6: 1336–1342

- Stem Cell Basics. 2009. National Institute of Health. Stem Cells, 19: 26 str.
- Hiyama A., Mochida J., Iwashina T., Omi H., Watanabe T., Serigano K., Sakai D. 2008. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. Journal of Orthopaedic Research, 26, 5: 589–600
- Hodgkiss-Geere H. M., Argyle D. J., Corcoran B. M., Whitelaw B., Milne E., Bennett D., Argyle S. A. 2012. Characterisation and cardiac directed differentiation of canine adult cardiac stem cells. Veterinary Journal, 191, 2: 176–182
- Horwitz E. M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F. C., Keating A. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy, 7, 5: 39–395
- Hutmacher D. W. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials, 21: 2529–2543
- Ieda M., Fu J. D., Delgado-Olguin P., Vedantham V., Hayashi Y., Bruneau B. G., Srivastava D. 2010. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. Cell, 142, 3: 375–386
- Ihan A. 1999. Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. Ljubljana, Kemomed: 64 str.
- Ihan A., Kopitar A. N. 2010. Imunski sistem - celice in tkiva. V: Imunološki priročnik. Kotnik V. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo: 190 str.
- Inaba M., Yamashita Y. M. 2012. Asymmetric stem cell division: precision for robustness. Cell Stem Cell, 11, 4: 461-469
- Izadpanah R., Trygg C., Patel B., Kriedt C., Dufour J., Gimble J. M., Bunnell B. A. 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. Journal of Cell Biochemistry, 99, 5: 1285–1297
- Jang S., Cho H. H., Cho Y. B., Park J. S., Jeong H. S. 2010. Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. Bio Medical Center for Cell Biology, 11: 1-25
- Jiang Y., Henderson D., Blackstad M., Chen A., Miller R. F., Verfaillie C. M. 2003. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 1: 11854–11860
- Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Verfaillie C. M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature, 418, 6893: 41–49

- Johnstone B., Hering T. M., Caplan A. I., Goldberg V. M., Yoo J. U. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental Cell Research*, 238, 1: 265–272
- Kamishina H., Deng J., Oji T., Cheeseman J. A., Clemons R. M. 2006. Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research*, 67, 11: 1921–1928
- Kang B. J., Ryu H. H., Park S. S., Koyama Y., Kikuchi M., Woo H. M., Kweon O. K. 2012. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *Journal of Veterinary Science*, 13, 3: 299–310
- Keating A. 2006. Mesenchymal stromal cells. *Current Opinion in Hematology*, 13, 6: 419–425
- Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24, 5: 1294–1301
- Kim B. J., Seo J. H., Bubien J. K., Oh Y. S. 2002. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *Neuroreport*, 13, 9: 1185–1188
- Kim E. Y., Lee K.-B., Yu J., Lee J. H., Kim K. J., Han K.-W., Kim M. K. 2014. Neuronal cell differentiation of mesenchymal stem cells originating from canine amniotic fluid. *Human Cell*, 27, 2: 51–58
- Kingham P. J., Kalbermatten D. F., Mahay D., Armstrong S. J., Wiberg M., Terenghi G. 2007. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Experimental Neurology*, 207, 2: 267–274
- Kisiel A. H., McDuffee L. A., Masaoud E., Bailey T. R., Esparza Gonzalez B. P., Nino-Fong R. 2012. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *American Journal of Veterinary Research*, 73, 8: 1305–1317
- Kitambi S. S., Chandrasekar G. 2011. Stem cells: A model for screening, discovery and development of drugs. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 4, 1: 51–59
- Knoblich J. A. 2008. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*, 132, 4: 583–597
- Kokai L. E., Rubin J. P., Marra K. G. 2005. The potential of adipose-derived adult stem cells as a source of neuronal progenitor cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 116, 5: 1453–1460

- Kopen G. C., Prockop D. J., Phinney D. G. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proceeding of the National Academy of Sciences, 96: 10711–10716
- Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K., Zetterberg E., Ringdén O. 2003. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Experimental Hematology, 31, 10: 890–896
- Lee K. S., Kang H. W., Lee H. T., Kim H. J., Kim C. L., Song J. Y., Cha S. H. 2014. Sequential sub-passage decreases the differentiation potential of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. Research in Veterinary Science, 96, 2: 267–275
- Lim J.-H., Boozer L., Mariani C. L., Piedrahita J., Olby N. J. 2010. Generation and characterization of neurospheres from canine adipose tissue-derived stromal cells. Cellular Reprogramming, 12, 4: 417–425
- Litwin J. 1971. Standardization of human diploid fibroblast cultivation: centrifugation procedure. Applied Microbiology, 21, 4: 575–579
- Maccarty W.C., Caylor H. D. 1922. Metaplasia in ovarian dermoids and cystadenomas: report of three cases. Annual of Surgery, 76: 238–245
- Maienschein J. 2010. Ross Granville Harrison (1870-1959) and perspectives on regeneration. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 314 B, 8: 607–615
- Marchal L., Luxardi G., Thomé V., Kodjabachian L. 2009. BMP inhibition initiates neural induction via FGF signaling and Zic genes - Topic1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106, 41: 17437–17442
- Martinello T., Bronzini I., Maccatrazzo L., Mollo A., Sampaolesi M., Mascarello F., Patruno M. 2011. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. Research in Veterinary Science, 91, 1: 18–24
- Martin-Rendon E., Watt S. M. 2003. Exploitation of stem cell plasticity. Transfusion Medicine, 13, 6: 325–349
- Marx C., Silveira M. D., Beyer Nardi N. 2015. Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. Stem Cells and Development, 24, 7: 803–813
- McIntosh K., Zvonic S., Garrett S., Mitchell J. B., Floyd Z. E., Hammill L., Gimble J. M. 2006. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. Stem Cells, 24, 5: 1246–1253
- Mezey E., Chandross G. J., Harta G., Maki R.A., McKercher S. R. 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. Science, 290, 5497: 1779–1782

- Minteer D. M., Marra K. G., Rubin J. P. 2015. Adipose stem cells: Biology, safety, regulation, and regenerative potential. *Clinics in Plastic Surgery*, 42, 2: 169-179
- Morange Michel. 2006. The history of stem cells. *stem cells: from basic research to therapy.* V: *Stem cells: from basic research to therapy.* 1st ed. Calegari F., Waskow C. New York, CRC Press: 670 str.
- Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher L. W., Robey P. G., Shi S. 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 10: 5807–5812
- Murphy S. V, Atala A. 2014. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32, 8: 773–785
- Nakahara H., Dennis J. E., Bruder S. P., Haynesworth S. E., Lennon D. P., Caplan A. I. 1991. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Experimental Cell Research*, 195, 2: 492–503
- Nathanson M.A. 1985. Bone matrix-directed chondrogenesis of muscle in vitro. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 200: 142–158
- Neuhuber B., Gallo G., Howard L., Kostura L., Mackay A., Fischer I. 2004. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *Journal of Neuroscience Research*, 77, 2: 192–204
- Neupane M., Chang C. C., Kiupel M., Yuzbasiyan-Gurkan V. 2008. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering. Part A*, 14, 6: 1007–1015
- Oedayrajsingh-Varma M. J., van Ham S. M., Knippenberg M., Helder M. N., Klein-Nulend J., Schouten T. E., van Milligen F. J. 2006. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*, 8, 2: 166–177
- Ormerod M. 1993. Flow Cytometry, First Principles. *Journal of Clinical pathology*, 46, 10: 975-977
- Park S.S., Lee Y. J., Lee S. H., Lee D., Choi K., Kim W.H., Han H. J. 2012. Functional recovery after spinal cord injury in dogs treated with a combination of matrigel and neural-induced adipose-derived mesenchymal Stem cells. *Cytotherapy*, 14, 5: 584–597
- Pettersson P., Van R., Karlsson M., Bjoerntorp P. 1985. Adipocyte precursor cells in obese and nonobese humans. *Metabolism*, 34, 9: 808–812
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Marshak D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 5411: 143–147

- Planat-Benard V., Silvestre J.S., Cousin B., André M., Nibbelink M., Tamarat R., Casteilla L. 2004. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, 109, 5: 656–663
- Prockop D. J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276, 5309: 71–74
- Puissant B., Barreau C., Bourin P., Clavel C., Corre J., Bousquet C., Blancher A. 2005. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British Journal of Haematology*, 129, 1: 118–129
- Raff M. 2003. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19: 1–22
- Ranga A., Gjorevski N., Lutolf M. P. 2014. Drug discovery through stem cell-based organoid models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 69, 70: 19–28
- Rasmusson I., Ringden O., Sundberg B., Le Blanc K. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*, 76, 8: 1208–1213
- Razavi S., Razavi M. R., Kheirollahi-Kouhestani M., Mardani M., Mostafavi F. S. 2013. Co-culture with neurotrophic factor secreting cells induced from adipose-derived stem cells: promotes neurogenic differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440, 3: 381–387
- Rodbell M. 1964. Metabolism of Isolated Fat Cells: I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 2: 375–380
- Roszek K., Marcin Dąbrowski, Justyna Danielewska, Wiesław Nowak, Noemi Makowska, Joanna Czarnecka D. P. 2016. Canine adipose-derived stem cells: purinergic characterization and neurogenic potential for therapeutic applications. *Journal of Cellular Biochemistry*, 9999: 1–8
- Rožman P., Strbad M., Knežević M. 2007. Uporaba matičnih celic v medicini. V: Genialna prihodnost - genetika, determinizem in svoboda: zbornik prispevkov. Mednarodni posvet Biološka znanost in družba, Ljubljana, 4-5 oktober. Struguc - Krajšek S., Popit T., Vičer M., Ljubljana, Zavod RS za šolstvo: 202-212
- Safford K. M., Hicok K. C., Safford S. D., Halvorsen Y.D. C., Wilkison W. O., Gimble J. M., Rice H. E. 2002. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294, 2: 371–9
- Sago K., Tamahara S., Tomihari M., Matsuki N., Asahara Y., Takei A., Ono K. 2008. In vitro differentiation of canine celiac adipose tissue-derived stromal cells into neuronal cells. *The Journal of Veterinary Medical Science the Japanese Society of Veterinary Science*, 70, 4: 353–357

- Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K., Muneta T. 2005. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis and Rheumatism*, 52, 8: 2521–2529
- Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., Hazzi C., Stedeford T., Willing A., Sanberg P. R. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental Neurology*, 164, 2: 224–256
- Schaffler A., Buchler C. 2007. Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells - Basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*, 25, 4: 818-827
- Schwarz C., Leicht U., Drosse I., Ulrich V., Luibl V., Schieker M., Röcken M. 2011. Characterization of adipose-derived equine and canine mesenchymal stem cells after incubation in agarose-hydrogel. *Veterinary Research Communications*, 35, 8: 487–499
- Screven R., Kenyon E., Myers M. J., Yancy H. F., Skasko M., Boxer L., Zhu M. 2014. Immunophenotype and gene expression profiles of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 161, 1–2: 21–31
- Selman K., Kafatos F. C. 1974. Transdifferentiation in the labial gland of silk moths: is DNA required for cellular metamorphosis? *Cell Differentiation*, 3, 2: 81–94
- Shi M., Ishikawa M., Kamei N., Nakasa T., Adachi N., Deie M., Ochi M. 2009. Acceleration of skeletal muscle regeneration in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human peripheral blood-derived CD133-positive cells. *Stem Cells*, 27, 4: 949–960
- Shi S. R., Liu C., Pootrakul L., Tang L., Young A., Chen R., Taylor C. R. 2008. Evaluation of the value of frozen tissue section used as “gold standard” for immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*, 129, 3: 358–366
- Sisakhtnezhad S., Matin M. 2012. Transdifferentiation: A cell and molecular reprogramming process. *Cell and Tissue Research*, 348, 3: 379-396
- Smith R. K. W. 2008. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disability and Rehabilitation*, 30, 20–22: 1752–1758
- Soldner F., Jaenisch R. 2012. iPSC disease modeling. *Science*, 338, 6111: 1155–1156
- Soncini M., Vertua E., Gibelli L., Zorzi F., Denegri M., Albertini A., Parolini O. 2007. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1, 4: 296–305
- Song H., Chung S. K., Xu Y. 2010. Modeling disease in human escs using an efficient bac-based homologous recombination system. *Cell Stem Cell*, 6, 1: 80–89
- Song L., Young N. J., Webb N. E., Tuan R. S. 2005. Origin and characterization of multipotential mesenchymal stem cells derived from adult human trabecular bone. *Stem Cells and Development*, 14, 6: 712–721

- Spees J. L., Olson S. D., Ylostalo J., Lynch P. J., Smith J., Perry A., Prockop D. J. 2003. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 5: 2397–402
- Spinella M. J., Kerley J. S., White K. A., Curtin J. C. 2003. Retinoid target gene activation during induced tumor cell differentiation: human embryonal carcinoma as a model. *Journal of Nutrition*, 133, 1: 273–276
- Swistowski A., Peng J., Liu Q., Mali P., Rao M. S., Cheng L., Zeng X. 2010. Efficient generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells under defined conditions. *Stem Cells*, 28, 10: 1893–1904
- Szabo E., Rampalli S., Risueño R. M., Schnerech A., Mitchell R., Fiebigcomyn A., Risuen R. M. 2010. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature*, 468, 7323: 521–526
- Takemitsu H., Zhao D., Yamamoto I., Harada Y., Michishita M., Arai T. 2012. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BioMedical Center of Veterinary Research*, 8, 1: 150-159
- Tosh D., Horb M. E. 2004. How cells change their phenotype. V: *Handbook of stem cells*. 1st ed. Robert Lanza, John Gearhart, Brigid Hogan, Douglas Melton, Roger Pedersen, James Thomson, Michael West. Academic Press, 2: 1760 str.
- van Velthoven C. T., Kavelaars A., Heijnen C. J. 2012. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. *Pediatric Research*, 71, 4: 474–481
- van Velthoven C. T., Kavelaars A., van Bel F., Heijnen C. J. 2011. Mesenchymal stem cell transplantation changes the gene expression profile of the neonatal ischemic brain. *Brain Behavior Immunology*, 25: 1342–1348
- van Velthoven C. T., Kavelaars A., van Bel F., Heijnen C. J. 2010. Repeated mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxia-ischemia has distinct effects on formation and maturation of new neurons and oligodendrocytes leading to restoration of damage, corticospinal motor tract activity and sensorimotor function. *Journal of Neuroscience*, 30: 9603–9611
- Verso M. L. 1971. Some nineteenth-century pioneers of haematology. *Medical History*, 15, 1: 55–67
- Vieira N. M., Brandalise V., Zucconi E., Secco M., Strauss B. E., Zatz M. 2010. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplantation*, 19, 3: 279–289
- Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z. P., Kokubu Y., Südhof T. C., Wernig M. 2010. Supplementary data - direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 463, 7284: 1035–1041

- Wakitani S., Saito T., Caplan A. I. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle & Nerve*, 18, 12: 1417–1426
- Wei X., Yang X., Han Z., Qu F., Shao L., Shi Y. 2013. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34, 6: 747–754
- Wislet-Gendebien S., Hans G., Leprince P., Rigo J.-M., Moonen G., Rogister B. 2005. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells*, 23, 3: 392–402
- Woodbury D., Schwarz E. J., Prockop D. J., Black I. B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 61, 4: 364–370
- Wu P., Sato K., Yukawa S., Hikasa Y., Kagota K. 2001. Differentiation of stromal-vascular cells isolated from canine adipose tissues in primary culture. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 63, 1: 17–23
- Yu J. M., Bunnell B. A., Kang S.-K. 2011. Neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *Methods in Molecular Biology*, 702: 219–231
- Yu J., Thomson J. A. 2008. Pluripotent stem cell lines. *Genes & Development*, 22, 15: 1987–1997
- Zeidán-Chuliá F., Noda M. 2009. “Opening” the mesenchymal stem cell tool box. *European Journal of Dentistry*, 3, 3: 240–249
- Zhang Z. G., Chopp M. 2009. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurology*, 8: 491–500
- Zemelko V. I., Kozhukharova I. B., Alekseenko L. L., Domnina A. P., Reshetnikova G. F., Puzanov M. V., Anisimov S. V. 2013. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, adipose tissue and endometrium: a comparative study. *Cell and Tissue Biology*, 7, 3: 235–244
- Zipori D. 2005. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells*, 23, 6: 719–726
- Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Hedrick M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 12: 4279–4295
- Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Hedrick M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7, 2: 211–228

ZAHVALA

Biti hvaležen pomeni biti spoštljiv do vseh tistih, ki so ti na kakršen koli način pomagali pri doseganju končnih ciljev. Prvo zahvalo bi posvetila mentorju prof. dr. Gregorju Majdiču, ki je sprejel mentorstvo in mi odprl vrata pri nabiranju izkušenj na področju matičnih celic. Neizmerno sem hvaležna za potrpežljivost, nasvete in vključitev v Center za genomiko živali in podjetju Animacel, kjer sem spoznala veliko strokovnjakov in odnesla veliko znanja.

Zahvaljujem se somentorici dr. Katerini Čeh za vodenje in organizacijo vseh poskusov, ki smo jih izvedli v sklopu magistrske naloge. Vedno si je vzela čas in bila korektna v vseh pogledih. Omogočila mi je sodelovanje v projektu » Po kreativni poti do praktičnega znanja«, kjer smo skupaj raziskovali vpliv gojišča na transdiferenciacijo MMC v živčne celice. Poleg tega mi je omogočila sodelovanje z inštitutom IMI na Medicinski fakulteti, UL v Ljubljani. Zahvaljujem se doc. dr. Andreji Nataši Kopitar za strokovne nasvete, povezane s pretočno citometrijo.

Veliko strokovnega znanja sem pridobila na Univerzi v Oslu, Oddelek za Nevrofiziologijo in Nacionalnemu centru za matične celice na Norveškem pod vodstvom prof.dr. Joela Gloverja. Hvala Suzane, Ushi, Atini, Hege za podporo, druženje in preneseno znanje. Brez njih mi nikakor ne bi uspelo pridobiti tako zanimivih rezultatov.

Posebno rada bi se zahvalila Luki Mohoriču za preneseno znanje pri rokovanju s celicami. Vedno je bil pripravljen pomagati pri vsem, kar smo delali. Hvala Nejcu Hrenu in Meti za pomoč pri izvajanju imunobarvanja ter za veliko nepozabnih trenutkov, ki smo jih skupaj doživeli v laboratoriju.

Zahvaljujem se recenzentu doc.dr. Miomirju Kneževiću za hiter in strokovni pregled poleg številnih obveznosti in službenih potovanj.

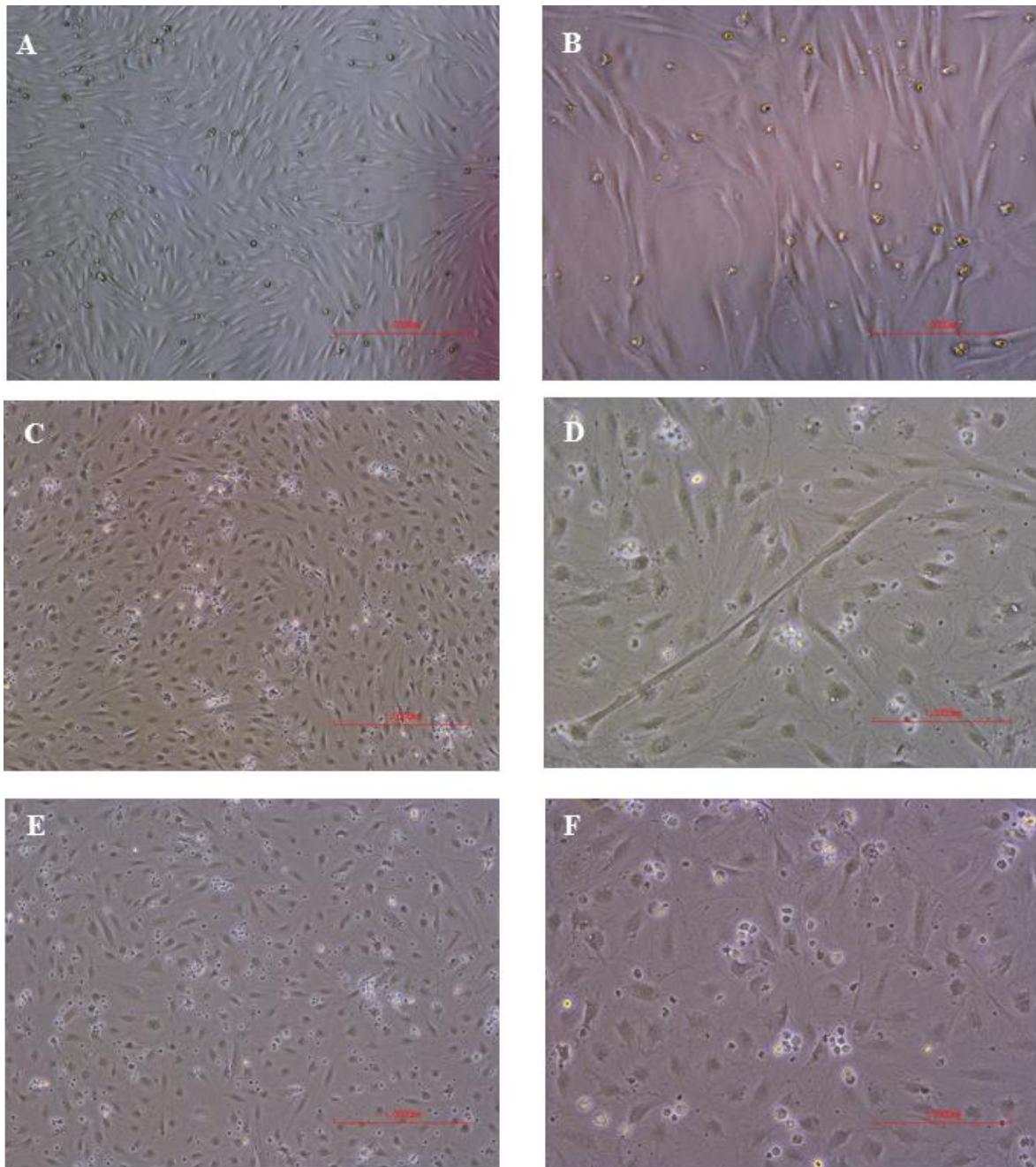
Hvala mojemu možu Matjažu za ljubezen, potrpežljivost in spodbudo v času dolgotrajnega pisanja, ki sem ga opravljala skoraj vsak dan po službi. Posebno sem hvaležna svoji dragi Saši, ki sem jo spoznala med študijem biotehnologije. Poleg tega sem hvaležna za spodbudo, motivacijo in strokoven pregled naloge.

Posebna zahvala gre moji družini v Makedoniji, mami Elici in očetu Ordetu, ki sta mi omogočila prihod v Slovenijo in me spodbujala pri vseh mojih podvigih. Hvala za zaupanje, ljubezen in vzgojo, da sem postala to, kar sem. Hvala sestri Ivani za potrpežljivost, razumevanje in spodbudne besede. Brez družine, sestre in priateljev ne bi bila tako izpopolnjena, kot se v resnici počutim.

Za konec bi se zahvalila svojima družinama v Sloveniji: družini Grgič za vso podporo in pomoč ter družini Zupančič, ki me je sprejela v svoj dom, ko sem prišla v Slovenijo leta 2008.

PRILOGA A

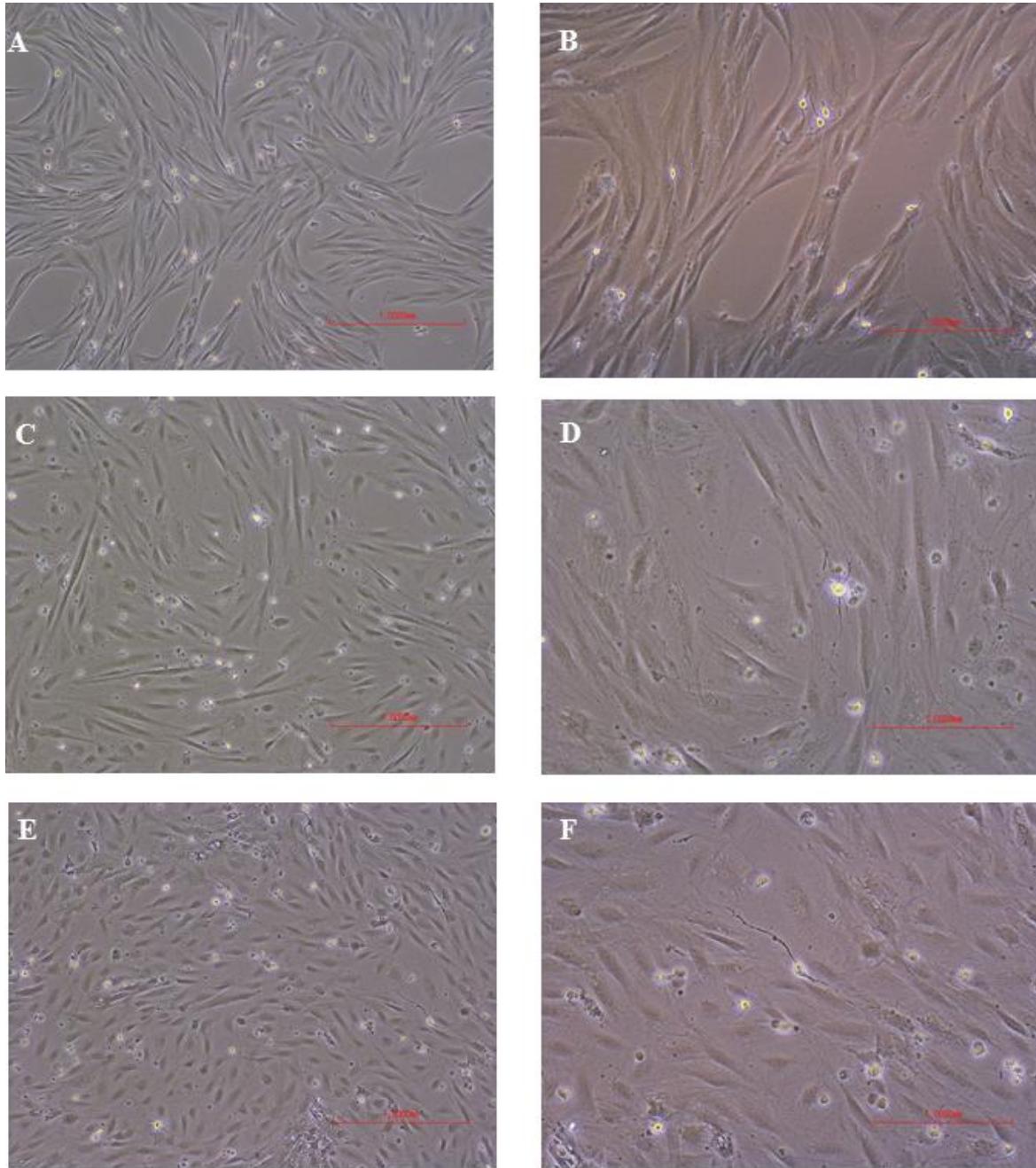
Morfološke spremembe pasjih MMC po 48h tretiranju v pre-diferenciacijskem gojišču
STIM 1 in diferenciacijskem gojišču NIMb



NIMb diferenciacijsko gojišče **A:** transdiferencirani MMC po 3 dnevnom tretiranju z NIMb, 10x povečava; **B:** transdiferencirani MMC po 3 dnevnom tretiranju z NIMb, 40x povečava; **C:** transdiferencirani MMC po 6 dnevnom tretiranju z NIMb, 10x povečava; **D:** transdiferencirani MMC po 6 dnevnom tretiranju z NIMb, 20x povečava. Opazimo prve vidne morfološke spremembe, ki kažejo, da so se nevrosferi spremenili v celice, ki imajo podobno morfologijo kot živčne celice; **E:** transdiferencirani MMC po 9 dnevnom tretiranju z NIMb, 10x povečava; **F:** transdiferencirani MMC po 9 dnevnom tretiranju z NIMb, 20x povečava;

PRILOGA B

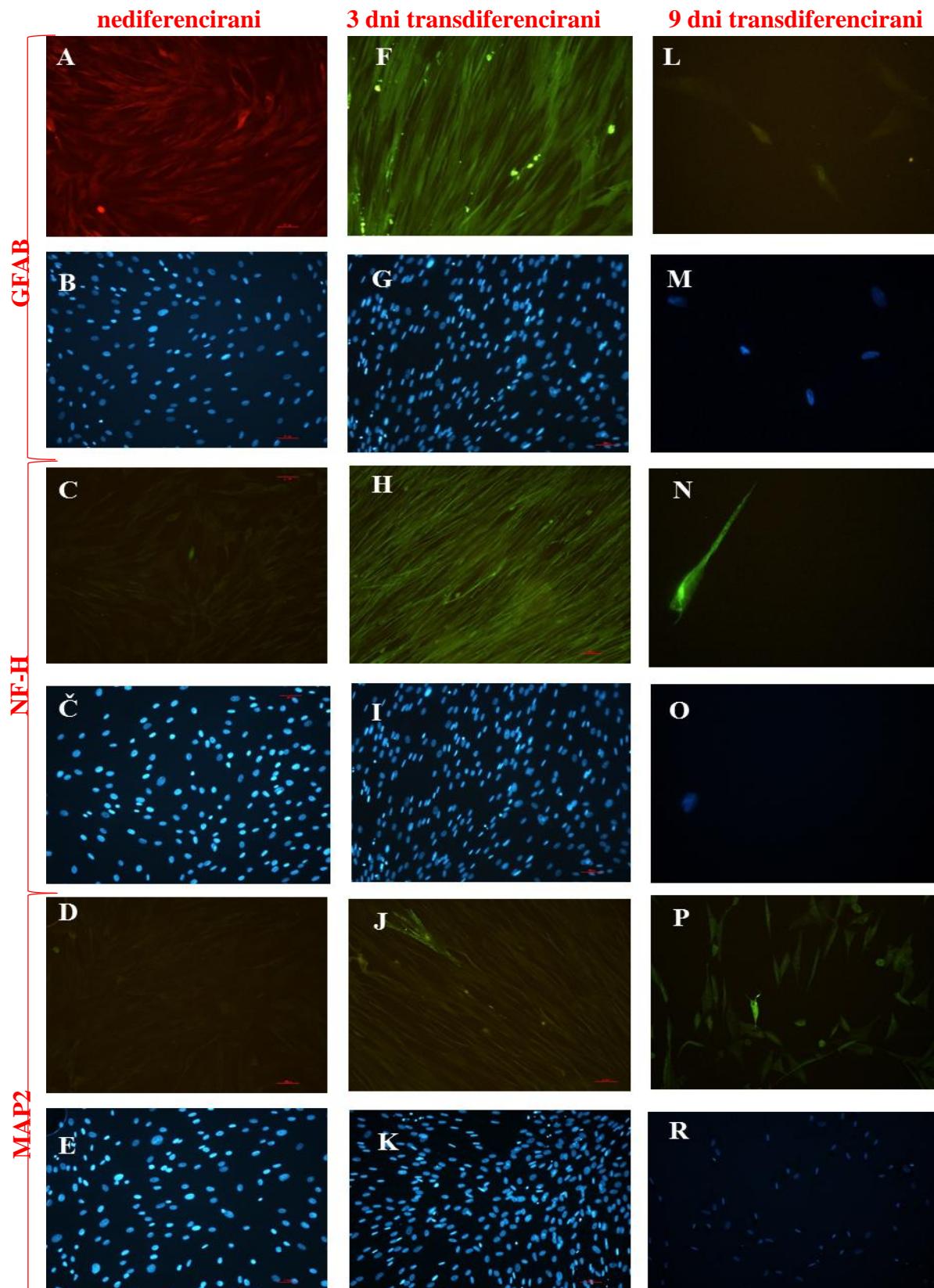
Morfološke spremembe pasjih MMC po 48 urnem tretiranju v pre-diferenciacijskem gojišču STIM 1 in diferenciacijskem gojišču NIMc



NIMc diferenciacijsko gojišče A: transdiferencirani MMC po 3 dnevnom tretiranju z NIMc, 10x povečava; **B:** transdiferencirani MMC po 3 dnevnom tretiranju z NIMc, 40x povečava; **C:** transdiferencirani MMC po 6 dnevnom tretiranju z NIMc, 10x povečava; **D:** transdiferencirani MMC po 6 dnevnom tretiranju z NIMc, 20x povečava. Opazimo prve vidne morfološke spremembe, ki kažejo, da so se nevrosferi spremenili v celice, ki imajo podobno morfologijo kot živčne celice; **E:** transdiferencirani MMC po 9 dnevnom tretiranju z NIMc, 10x povečava; **F:** transdiferencirani MMC po 9 dnevnom tretiranju z NIMc, 20x povečava;

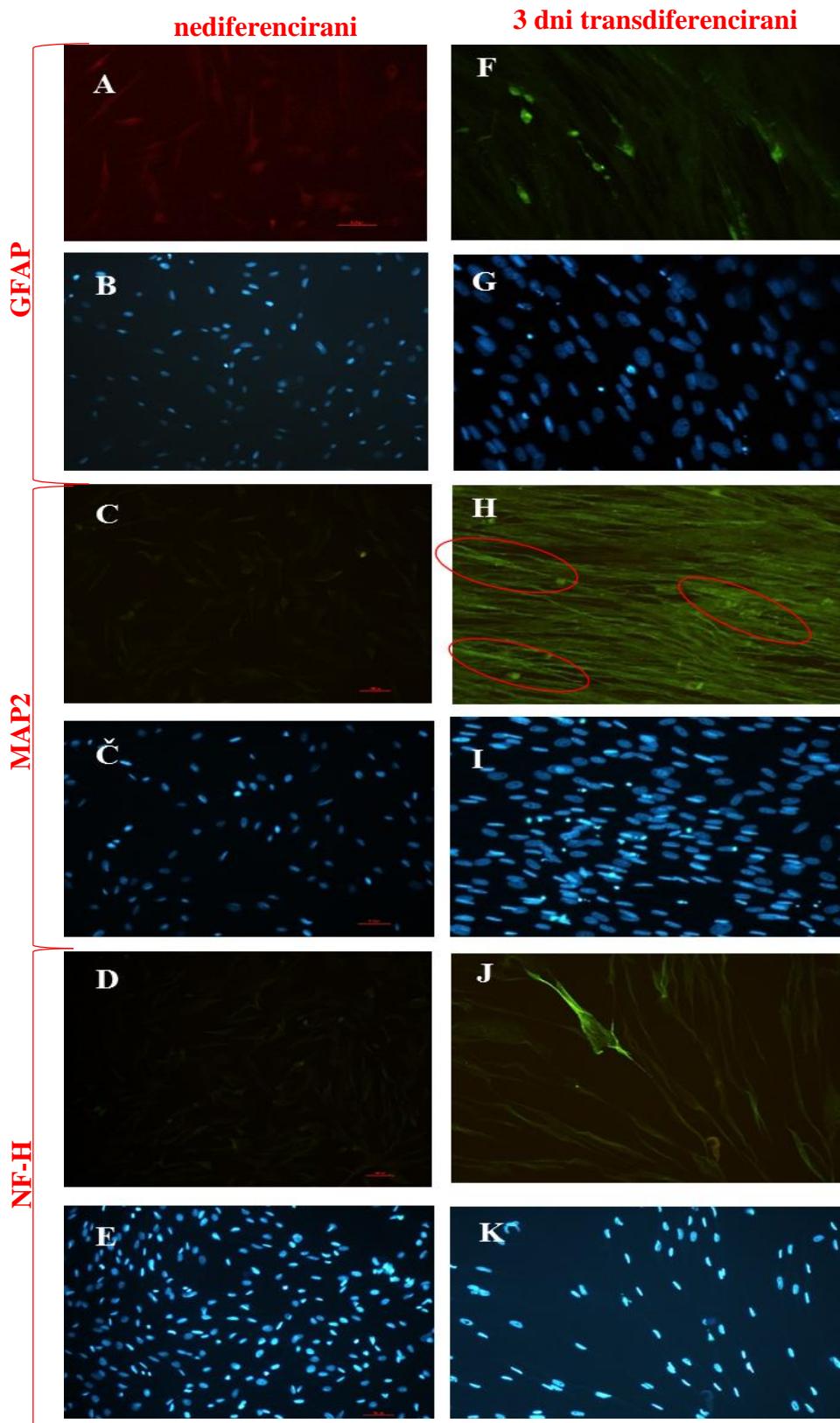
PRILOGA C

Transdiferenciacija pasjih MMC, osamljenih iz maščobnega tkiva (moški spol).



PRILOGA D

Transdiferenciacija pasjih MMC, osamljenih iz maščobnega tkiva (ženski spol).



PRILOGA E

Tabelarni prikaz podatkov, pridobljenih z merjenjem deleža pozitivnih celic za GFAP, MAP2 in NF-H označevalcev pri vseh živalih vključenih v magistrskem delu.

Časovne točke	Celični označevalci	AT0615 (M)	AT0515 (M)	CRO115 (M)	CRO0315 (Ž)	SLO0115 (Ž)	AT0215 (Ž)	STDEV.P glede na celični označevalec za vseh 6 živali
nediferencirane	GFAP	2,0	3,8	1,1	4,4	6,5	5,0	2,0
	MAP2	0,3	0,9	1,1	0,1	1,4	1,4	0,6
	NF-H	0,8	1,1	2,3	0,6	0,9	1,1	0,6
3 dni transdiferencirane	GFAP	26,3	90,0	90,8	81,6	90,6	48,3	27,4
	MAP2	33,7	33,5	33,6	30,3	22,8	33,2	4,3
	NF-H	33,5	32,1	32,3	34,0	31,7	34,2	1,1
9 dni transdiferencirane	GFAP	16,8	6,2	30,3	16,0	44,6	32,1	13,9
	MAP2	12,4	3,3	11,4	2,1	15,3	23,3	7,9
	NF-H	8,9	2,2	8,4	1,0	11,2	23,0	7,9

PRILOGA F

Tabelarni prikaz povprečnih deležev pozitivnih celic za GFAP, MAP2 in NF-H označevalcev glede na spol.

Časovne točke	Celični označevalci	Povprečje		SD(S)	2*SD(S)	SD(S)	2*SD(S)
		Moški spol	Ženski spol				
nediferencirane	GFAP	2,3	5,3	1,4	2,7	1,1	2,1
	MAP2	0,7	1,4	0,4	0,8	0,0	0,1
	NF-H	1,4	0,9	0,8	1,6	0,3	0,5
3 dni transdiferencirane	GFAP	90,4	73,5	0,6	1,1	22,3	44,6
	MAP2	33,6	28,8	0,1	0,2	5,4	10,7
	NF-H	32,6	33,3	0,8	1,5	1,4	2,8
9 dni transdiferencirane	GFAP	17,8	30,9	12,1	24,2	14,3	28,7
	MAP2	9,0	13,6	5,0	10,0	10,7	21,4
	NF-H	8,7	11,7	0,4	0,7	11,0	22,0

PRILOGA G

Tabelarni prikaz statistično obdelanih rezultatov viabilnosti celic med transdiferenciacijo v treh časovnih točkah.

Oznaka psa	Časovne točke transdif.	Povprečno število celic		Geometrijska sredina		SE	sum (SE)	STDEV	Varianca (populacija)	p-vrednost	
		% zive	% mrtve	% zive	% mrtve						
AT0515 (M)	nediferencirane	97,34	2,66	97,91	2,08	0,32214	2,779	1,179	0,926276978	0,090064446	
CRO115 (M)		99,27	0,73			1,85050					
AT0615 (M)		97,13	2,87			0,60626					
AT0215 (Ž)		99,35	0,65	99,27	0,73	0,00688	0,126	0,251	0,042067211		
CRO0315 (Ž)		98,99	1,01			0,07948					
SLO0115 (Ž)		99,47	0,53			0,03985					
AT0515 (M)	3 dni transdiferenciacije	96,54	3,46	97,92	2,08	1,89933	2,919	1,208	0,973134076	0,162317146	
CRO115 (M)		98,46	1,54			0,29037					
AT0615 (M)		98,77	1,23			0,72978					
AT0215 (Ž)		98,79	1,21	98,83	1,17	0,00159	0,002	0,035	0,000827084		
CRO0315 (Ž)		98,84	1,16			0,00018					
SLO0115 (Ž)		98,85	1,15			0,00071					
AT0515 (M)	9 dni transdiferenciacije	92,38	7,62	93,50	6,50	1,24840	1,911	0,977	0,636825289	0,00624561	
CRO115 (M)		93,94	6,06			0,20150					
AT0615 (M)		94,17	5,83			0,46062					
AT0215 (Ž)		84,71	15,29	83,40	16,57	1,70179	13,240	2,573	4,412745976		
CRO0315 (Ž)		85,11	14,89			2,92582					
SLO0115 (Ž)		80,47	19,53			8,61277					