

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Vid BORKO

**VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA POVRNITEV PRIMARNIH
LASTNOSTI HRUSTANČNIH CELIC**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE
RECONSTRUCTION OF PRIMARY ATRIBUTES OF
CHONDROCYTES**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključno delo univerzitetnega študija živilske tehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratorijih Zavoda RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani in podjetju Educell d.o.o v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija živilske tehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja, za somentorja prof. dr. Marjana Simčiča, za recenzenta doc. dr. Miomirja Kneževiča.

Za raziskovalno delo s celicami, ki ostanejo po implantaciji avtolognih hondrocitov je bila odobrena vloga na Komisiji za medicinsko etiko Republike Slovenije v Ljubljani. (št. 91/05/05).

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Somentor: prof. dr. Marjan Simčič

Recenzent: doc. dr. Miomir Kneževič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član: prof. dr. Peter Raspor
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Marjan Simčič
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Miomir Kneževič
 Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Vid Borko

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 602.9:616.71-018.3 (043)=163.6
KG tkivne kulture/biotehnologija/hondrociti/metode gojenja hondrocitov/gojenje hondrocitov/dediferenciacija hondrocitov/rediferenciacija hondrocitov/živost celic
AV BORKO, Vid
SA RASPOR, Peter (mentor) / SIMČIČ, Marjan (somentor) / KNEŽEVIĆ, Miomir (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2010
IN VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA POVRNITEV PRIMARNIH LASTNOSTI HRUSTANČNIH CELIC
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIII, 41 str., 15 sl., 46 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen diplomske naloge je bil ugotoviti vpliv rotacijskega bioreaktorja na gojenje hondrocitov v tridimenzionalnem nosilcu iz mešanice alginata in agaroze. Poskus smo opravili na vzorcih sklepnega hrustančnega tkiva štirih bolnikov. Izolirane hondrocite smo gojili v enoslojni kulturi do prve pasaže. Po encimski obdelavi s tripsinom smo celice nasadili v 3D statično in bioreaktorsko kulturo. Hondrocite smo gojili 14 oz. 28 dni v gojišču z dodatkom 15% humanega seruma. Med gojenjem smo spremljali spremembe v morfologiji hondrocitov. Režine diskov smo barvali z barviloma kalcein AM in etidijevim homodimerom. Živost celic smo določali kvalitativno s pomočjo invertnega in fluorescenčnega mikroskopa. Po gojenju hondrocitov smo analizirali izražanje genov, specifične za hialini hrustanec (*col II*, *agr*) in vezivni hrustanec (*col I*, *ver*). Iz celic smo izolirali celotno RNA, jo prepisali v cDNA in analizirali izražanje genov z metodo verižnega pomnoževanja v realnem času (qPCR). Morfologija hondrocitov se je med gojenjem v enoslojnih kulturah spremenila iz okrogle v fibroblastno, kar kaže na proces dediferenciacije. Po nasaditvi dediferenciranih celic v diske iz hidrogela, ki smo jih gojili v bioreaktorju in statičnih pogojih, je prišlo do spremembe nazaj v sferično morfologijo, kar kaže na proces rediferenciacije. Živost celic v diskih iz hidrogela je bila visoka ne glede na način kultivacije. Dokazali smo značilno razliko med izražanjem genov v enoslojni in tridimenzionalni kulturi (rediferenciacijo hondrocitov v tridimenzionalnem okolju), ne pa tudi pozitivnega učinka bioreaktorja na proces rediferenciacije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 602.9:616.71-018.3 (043)=163.6
CX tissue culture/biotechnology/chondrocytes/culturing chondrocytes/methodes of culturing chondrocytes/dedifferentiation chondrocytes/ redifferentiation of chondrocytes/cell viability
AU BORKO, Vid
AA RASPOR, Peter (supervisor) / SIMČIČ, Marjan (co-advisor) / KNEŽEVIĆ, Miomir (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department for Food Science and Technology
PY 2010
TI INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE RECONSTRUCTION OF PRIMARY ATRIBUTES OF CHONDROCYTES
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIII, 41 str., 15 sl., 46 vir.
LA sl
AL sl/en
AB The purpose of this graduation thesis was to establish the impact of the rotating-wall-vessel bioreactor on chondrocytes seeded into a hydrogel scaffold. Experiment was made on specimens of four different patients, cells were cultured in monolayer cultures up to first passage. After treating cultures with trypsin, cells were seeded in three-dimensional (3D) culture and grown in bioreactor or static culture system. Cells were cultivated 14 and 28 days in a 15% human serum media. The viability of chondrocytes was determined qualitatively by staining thin slices of hydrogel with calcein AM and ethidium homodimer and by examining the stained slices under light and fluorescent microscope, respectively. The expression of specific genes after the cultivation has been studied: chondrocyte specific genes *col II* and *agr* (coding for collagen II and aggrecan), and fibroblast specific genes *col I* and *ver* (coding for collagen I and versican). Total RNA was isolated the cells, reverse transcribed to cDNA, and analysed by qPCR method. The morphology of chondrocytes changed during monolayer culturing from spherical to fibroblastic, showing dedifferentiation process. In gel constructs, the morphology changed back to spherical, which is a sign of redifferentiation process. Cell viability in hydrogel constructs was good for all culturing systems. We proved significant difference between the expression of tested genes in monolayer and three-dimensional cultures, proving redifferentiation of chondrocytes in hydrogels. Positive effect of bioreactor culture system on the chondrocyte re-differentiation process has not been proven.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVAR	XII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN NALOGE	2
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TKIVNO INŽENIRSTVO	3
2.1.1 Celice, ki se uporabljajo v tkivnem inženirstvu	3
2.2 HRUSTANČNO TKIVO	4
2.2.1 Splošne in morfološke lastnosti hrustanca ter njegova funkcija	4
2.2.2 Izvencelični matriks hialinega sklepnega hrustančnega tkiva	5
2.2.2.1 Kolageni	5
2.2.2.2 Proteoglikani	5
2.2.2.3 Voda	6
2.3 BIOREAKTORJI ZA TKIVNE KULTURE	6
2.3.1 Splošna dejstva o bioreaktorjih za tkivne kulture	6
2.3.2 Bioreaktorji namenjeni gojenju hrustanca	6
2.3.2.1 Bioreaktorji z mehanskim načinom mešanja	7
2.3.2.2 Perfuzijski bioreaktor	8
2.3.2.3 Rotacijski bioreaktor	8
2.4 METODE ZA ANALIZO IZRAŽANJA GENOV	9
2.5 METODE GOJENJA HONDROCITOV	10
2.5.1 Enoslojna kultura	10
2.5.2 Tridimenzionalne kulture	10
2.5.3 Peletna kultura	10
2.6 NOSILCI KI SE UPORABLJAJO V TKIVNEM INŽENIRSTVU	11
2.6.1 Funkcija in namen uporabe nosilcev	11
2.6.2 Sintetični polimerni materiali	11
2.6.2.1 Polilaktična (PLK) in poliglikolna (PGK) kislina	11
2.6.3 Naravni materiali	12

2.6.3.1	Agaroza in alginat	12
2.6.3.2.	Kolageni	12
2.6.3.3.	Hitozan	13
3	MATERIAL IN METODE	14
3.1	POTEK POSKUSA	14
3.2	POSTOPEK GOJENJA CELIČNIH KULTUR	15
3.2.1	Uporabljene kemikalje, potrošni material in laboratorijska oprema	15
3.2.1.1	Kemikalje	15
3.2.1.2	Droben laboratorijski material	15
3.2.1.3	Laboratorijska oprema	16
3.2.2	Priprava primarne kulture hondrocitov iz zamrznjenih vzorcev celic	16
3.2.2.1	Odmrzovanje vzorca	16
3.2.2.2	Priprava primarne kulture	16
3.2.3	Nasaditev hondrocitov v prvo pasažo	17
3.2.3.1	Tripsinizacija	17
3.2.3.2	Štetje celic s hemocitometrom	17
3.2.3.3	Nasaditev celic v prvo pasažo	17
3.2.3.4	Shranjevanje celic v tekočem dušiku	18
3.2.4	Nasaditev celic v drugo pasažo, diske iz hidrogela ter zagon bioreaktorja	18
3.2.5	Dohranjevanje celičnih kultur hondrocitov	19
3.2.6	Odvzem vzorcev za nadaljnje analize	19
3.3	KVALITATIVNO DOLOČANJE ŽIVOSTI HONDROCITOV V DISKIH IZ GELA	19
3.3.1	Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema	19
3.3.1.1	Kemikalije	19
3.3.1.2	Droben laboratorijski material	20
3.3.1.3	Laboratorijska oprema	20
3.3.2	Barvanje rezin gela z barviloma kalcein AM in etidijev homodimer	20
3.4	KVANTITATIVNO DOLOČANJE IZRAŽANJA SPECIFIČNIH GENOV V VZORCIH ENOSLOJNIH IN TRIDIMENZIONALNIH KULTUR	20
3.4.1	Uporabljene kemikalje, potrošni material in laboratorijska oprema	20
3.4.1.1	Kemikalije	20
3.4.1.2	Droben laboratorijski material	21
3.4.1.3	Laboratorijska oprema	21
3.4.2	Izolacija RNA	21

3.4.3	Prepis RNA v cDNA	22
3.4.4	Verižna reakcija pomnoževanja v realnem času (qPCR)	22
4	REZULTATI	24
4.1	MORFOLOGIJA HONDROCITOV GOJENIH V ENOSLOJNI KULTURI	24
4.2	ŽIVOST CELIC ZNOTRAJ GELA PO 30-IH DNEH GOJENJA	26
4.3	IZRAŽANJE GENOV SPECIFIČNIH ZA SKLEPNO HRUSTANČNO TKIVO-DEDIFERENCIACIJA IN REDIFERENCIACIJA HONDROCITOV	28
5	RAZPRAVA	33
5.1	FENOTIPSKE LASTNOSTI HONDROCITOV, GOJENIH V ENOSLOJNI, TRIDIMENZIONALNI IN BIOREAKTORSKI KULTURI	33
5.2	SKLEPI	36
6	POVZETEK	37
7	VIRI	38

KAZALO SLIK

Slika 1	Teritorijska zgradba hialine hrustančevine. (KU Medical Center. 1996).	4
Slika 2	Rotacijski bioreaktor Synthecon RCCS 4D (Synthecon, 2000)	8
Slika 3	Grafično predstavljen rezultat verižnega pomnoževanja v realnem času (qPCR).	9
Slika 4	Shema poteka gojenja hondrocitov	14
Slika 5	Fotografije primarnih kultur vzorca NN posnetih po določenem času gojenja in pri različnih povečavah. a) Ob dnevu nasaditve, 100-kratna povečava; b) Po prvem dnevu gojenja, 100-kratna povečava; c) Po devetih dnevih gojenja, 40-kratna povečava; d) Po devetih dnevih gojenja, 100-kratna povečava	24
Slika 6	Fotografije kultur hondrocitov, vzorcev NN in KL, namnoženih v enoslojni kulturi in nasajenih v hidrogel (40-kratne povečave). a) vzorec NN v hidrogelu po 14-ih dnevih gojenja v statični kulturi b) vzorec NN v hidrogelu po 14-ih dnevih gojenja v bioreaktorski kulturi; c) vzorec KL v hidrogelu po 28-ih dnevih gojenja v statični kulturi; d) vzorec KL v hidrogelu po 28-ih dnevih gojenja v bioreaktorski kulturi.	25
Slika 7	Fotografiji rezin diskov vzorca RK iz hidrogela pred barvanjem s fluorescenčnima barviloma. Fotografiji sta posneti pri 40-kratni povečavi. a) Rezina diska iz statične kulture b) Rezina diska iz bioreaktorske kulture	26
Slika 8	Fotografiji rezin diskov vzorca RK iz hidrogela po barvanju s fluorescenčnim barvilom kalcein AM. Žive celice svetijo zeleno. Fotografiji sta posneti pri 40-kratni povečavi. a) Rezina diska iz statične kulture b) Rezina diska iz bioreaktorske kulture	26

Slika 9	Fotografiji rezin diskov vzorca RK iz hidrogela po barvanju s fluorescenčnim barvilom etidijev homodimer. Mrtve celice svetijo rdeče. Fotografiji sta posneti pri 40-kratni povečavi. a) Rezina diska iz statične kulture b) Rezina diska iz bioreaktorske kulture	27
Slika 10	Vrednosti izražanja gena kolagen II tekom gojenja v monoslojni kulturi, 3D statični in 3D bioreaktorski kulturi. Prikazane so srednje vrednosti s standardno napako.	29
Slika 11	Vrednosti izražanja gena agrekan tekom gojenja v monoslojni kulturi, 3D statični in 3D bioreaktorski kulturi. Prikazane so srednje vrednosti s standardno napako.	30
Slika 12	Vrednosti izražanja gena kolagen I tekom gojenja v monoslojni kulturi, 3D statični in 3D bioreaktorski kulturi. Prikazane so srednje vrednosti s standardno napako.	30
Slika 13	Vrednosti izražanja gena verzikan tekom gojenja v monoslojni kulturi, 3D statični in 3D bioreaktorski kulturi.	31
Slika 14	Povprečne vrednosti diferenciacijskih indeksov col II/col I pri vzorcih monoslojnih kultur, 3D statične ter 3D bioreaktorske kulture.	31
Slika 15	Povprečne vrednosti diferenciacijskih indeksov agr/ver pri vzorcih monoslojnih kultur, 3D statične ter 3D bioreaktorske kulture.	32

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Preglednica prikazuje metode gojenja in vrednosti relativne genske ekspresije za posamezen gen in vzorec. Podane so tudi vrednosti diferenciacijskih indeksov kol II/kol I in agr/ver.....	28
---	----

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

cDNA	komplementarna DNA, ki nastane z obratno transkripcijo iz mRNA
Ct	mejni cikel pri qPCR
dATP	deoksiadenin-trifosfat
dCTP	deoksicitozin-trifosfat
DEPC	dietilpirokarbonat
dGTP	deoksigvanin-trifosfat
D-MEM	Dulbeccova modifikacija Eaglovega medija
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid-trifosfat
dTTP	deoksitimin-trifosfat
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
HBSS	Hanksova ozmolarna raztopina soli
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
nm	nanometer
PBS	slani fosfatni pufer
RNA	ribonukleinska kislina
rpm	vrtljaji na minuto
qPCR	verižna reakcija pomnoževanja v realnem času (kvantitativni PCR – qPCR)
SD	standardna deviacija (odklon)

SLOVAR

agrekan	poglavitni proteoglikan sklepnega hrustančnega tkiva
avtologna implantacija hondrocitov	postopek zdravljenja sklepnih poškodb bolnika z njemu lastnimi hrustančnimi celicami, gojenimi <i>in vitro</i>
bioreaktor	je umeten sistem v katerem teče biološki proces, s katerim pridemo do človeku uporabnih snovi - poskuša zagotoviti optimalne abiotske pogoje
celična kultura	metoda gojenja evkariontskih celic <i>in vitro</i>
dediferenciacija	proces spreminjanja fenotipa celice v manj tkivno specifično obliko
enoslojna kultura	metoda gojenja celic s sposobnostjo pritrditve na podlago v gojilnih posodah
fenotip	lastnosti organizma, ki so določene z zapisi v genomu in okoljskimi dejavniki med razvojem organizma – strukturne in funkcijske lastnosti organizma, ki jih lahko opazamo
hondrocit	osnovna celična enota hrustančnega tkiva
hrustanec	specifična oblika tkiva, sestavljena iz hondrocitov in obilnega izvenceličnega matriksa
kolagen	poglavitna proteinska sestavna enota izvenceličnega matriksa hondrocitov
konfluenca	pojav, ko celice v enoslojni kulturi prerastejo dno gojilne posode in so v stiku ena z drugo
mezenhim	embrionalno tkivo, iz katerega se med ostalim razvije tudi hrustančno tkivo
reverzna transkripcija	postopek prepisa RNA v cDNA s pomočjo encima reverzna transkriptaza

tkivno inženirstvo	<i>in vitro</i> priprava pripravka iz zdravih celic in nosilca, ki poskuša nadomestiti poškodovano tkivo
tripsinizacija	postopek odlepljanja celic enoslojne kulture z dna gojilne posode s pomočjo encima tripsin
tridimenzionalna kultura	metoda gojenja evkariontskih celic v različnih nosilnih strukturah, ki omogočajo rast v treh dimenzijah prostora
verzikan	poglavitna komponenta izvenceličnega matriksa vezivnega hrustančnega tkiva
vitalno barvanje	postopek diferenciacijskega barvanja celic s pomočjo barvil, ki pobarvajo ali žive ali mrtve celice in omogočajo njihovo ločevanje

1 UVOD

Gojenje hondrocitov predstavlja pomembno področje tkivnega inženirstva in regenerativne medicine. Hondrocite najpogosteje uporabljamo pri zdravljenju mehanskih poškodb sklepov, v manjši meri se jih uporablja v rekonstrukcijski kirurgiji obraza, rekonstrukciji obsežnih segmentov sapnika itd. Že danes pa jih uporabljamo tudi za zdravljenje bolezni kot npr. zdravljenje vezikouretralnega refluksa.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Med hrustančna tkiva štejemo hialini, elastični in vezivni hrustanec. Sklepni ali artikularni hrustanec je vrsta hialinega hrustanca, ki s pomočjo sinovialne tekočine omogoča gibanje dveh sklepnih površin z minimalnim trenjem ter s prerazporejanjem sil ublaži obremenitve na subhondralno kost. Hialini hrustanec je specializirana oblika vezivnega tkiva, ki je sestavljen iz manjšega števila hondrocitov in obilnega izvenceličnega matriksa. Matriks deluje kot okolje za difuzijo hranil v tkivo in je odgovoren za biomehanske lastnosti hrustančnega tkiva. Zunajcelični matriks ščiti hondrocite pred mehanskimi poškodbami ter celicam ohranja obliko in fenotipske lastnosti, med katerimi je bistvena tvorba kolagena II in agrekana. V fibroznem hrustančnem tkivu namreč prevladuje kolagen I, tvorba agrekana pa je zmanjšana. Fibrozno tkivo nudi manjšo biomehansko podporo sklepu in hitro razpade, posledica je nastanek artritisa. Možno rešitev za pomoč pri zdravljenju poškodb hrustanca predstavlja postopek implantacije avtogenih hondrocitov gojenih *in vitro*.

Metoda temelji na odvzemu delčkov zdravega hrustanca z manj obremenjene površine kolenskega sklepa, iz katerega se encimsko izolirajo posamezne hrustančne celice. Za namnožitev hrustančnih celic do ustreznega števila, potrebnega za vnos v bolnika, se uporablja postopek gojenja celic v celičnih kulturah, najpogosteje v obliki enosloja. Dobra lastnost gojenja v enoslojni kulturi je, v primerjavi z tridimenzionalnimi sistemi, hitra celična rast in preprostost postopkov, slabost pa hitra dediferenciacija. Dediferenciranim celicam se poskuša povrniti specifični fenotip tako, da se jih nasadi v tridimenzionalne nosilce. Takšni nosilci so zgrajeni iz različnih polimerov, njihova prednost pa je simulacija naravnega okolja, ki omogoča izražanje ustrežnejšega fenotipa. Da bi bila povrnitev izgubljenega fenotipa popolnejša, se vse pogosteje uporabljajo naprave, ki na bolj ali manj uspešen način posnemajo obremenitve, ki so prisotne v naravnem okolju hondrocitov. Takšne naprave imenujemo bioreaktorji.

1.2 NAMEN NALOGE

V diplomski nalogi bomo iz celic sklepnega hrustanca štirih bolnikov pripravili celične kulture v obliki enosloja. Nato bomo celice nasadili v hidrogel iz alginata in agaroze ter jih gojili v statični in biorektorski kulturi. Namen naloge je ugotoviti vpliv rotacijskega bioreaktorja na stopnjo rediferenciacije predhodno dediferenciranih hondrocitov.

Želimo:

- Spremljati živost celic znotraj hidrogela po 14 in 28-ih dneh gojenja
- Ugotoviti spremembo izražanja genov, specifičnih za hialini sklepni hrustanec med gojenjem hondrocitov v prvi pasaži enosloja in diskah iz hidrogela
- Ugotoviti razlike izražanja genov v statični in biorektorski kulturi pri celicah gojenih v hidrogelu po 14 in 28-ih dneh gojenja
- Kvantitativno ovrednotiti izražanje izbranih genov

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Pričakujemo, da bo gojenje hondrocitov v tridimenzionalnem okolju zavrlo proces dediferenciacije, do katerega pride tekom gojenja v enoslojni kulturi, ter do določene stopnje povrnilo celicam lastnosti, značilne za hialini fenotip hondrocitov. Pričakujemo povišano stopnjo izražanja za hialini hrustanec specifičnih genov pri hondrocitih gojenih v diskah iz hidrogela. Nadalje pričakujemo pozitiven vpliv biorektorskih pogojev na izražanje genov značilnih za hialini tip hrustančnega tkiva v primerjavi s statično kulturo. Pričakujemo tudi nižjo živost celic v osrednjem delu diska zaradi slabšega dostopa do hranilnih snovi in kisika.

2 PREGLED OBJAV

Tkivno inženirstvo je interdisciplinarna znanstvena veda, ki združuje principe tehnološkega inženirstva ter naravoslovnih in medicinskih znanosti v smeri razvijanja bioloških nadomestkov, ki vračajo, ohranjajo ali izboljšujejo funkcijo okvarjenih tkiv in organov. Novo tkivo nastane bodisi znotraj bodisi zunaj telesa. Za razvoj tkiva potrebujemo celice, spodbudo za rast oz. rastni faktor in nosilec. Nova tkiva bi naj bila čim bolj podobna zdravemu tkivu in naj ne bi s časom izgubljala svojih bioloških lastnosti (Vacanti in Langer, 1999).

2.1 TKIVNO INŽENIRSTVO

Hrustancu se na področju tkivnega inženirstva posveča velik del pozornosti. Razlog za to je njegova relativno preprosta sestava in zgradba. Sestavlja ga samo ena vrsta celic. Velika pozornost se hrustancu namenja tudi zato, ker predstavljajo obolenja hrustanca velik in nerešen problem medicine. Na svetu letno oboli za te vrste težavami na deset tisoče ljudi. To je veliko tržišče, ki potrebuje kakovosten produkt in to kar se da hitro (Darling in Athanasiou, 2003).

Sklepni hrustanec ima zaradi specifične, zgoraj omenjene zgradbe omejeno sposobnost celjenja po poškodbah in boleznih. Že majhne, lokalizirane okvare sklepne površine lahko vodijo v razširjeno degeneracijo sklepa (artrozo), ki kasneje velikokrat zahteva zamenjavo sklepa z umetno endoprotezo. V začetku devetdesetih so se pričele razvijati nove kirurške metode za popravo poškodovanega hrustanca in zaustavitev degenerativnih sprememb v kolenskem sklepu. V razširjeni klinični uporabi sta se uveljavili mozaična plastika in vsaditev avtolognih hrustančnih celic. Vsaditev avtolognih hrustančnih celic je metoda, pri kateri iz kolena artroskopsko odvzamemo koščke zdravega hrustanca iz neobremenjene sklepne površine. Iz njih v kulturi namnožimo hrustančne celice ter jih vrnemo v sklep na mesto poškodbe. Omejitve predstavljajo velikost poškodbe in difuzne degenerativne spremembe v sklepu (Radosavljevič in sod., 2003).

2.1.1 Celice, ki se uporabljajo v tkivnem inženirstvu

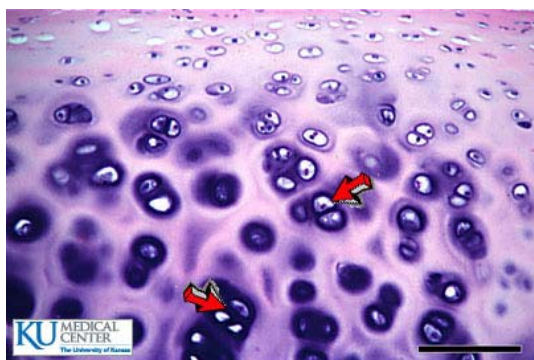
Preučili smo že vsa tkiva človeškega organizma z namenom obogatiti znanje na področju tkivnega inženirstva. Za zdravljenje uporabljamo predvsem celice, ki izvirajo iz pacienta (avtologne celice), lahko jih donira bližnji sorodnik ali drug posameznik (alogenske celice). Mnogokrat je zagotovitev zadostnega števila primernih celic za zdravljenje ovira zato bi bil vir, ki bi zmeraj izpolnjeval potrebe po takšnih celicah, dobrodošel. Takšen vir bi lahko predstavljale izolirane matične celice. Embrionalne matične celice imajo namreč sposobnost razviti se v vse diferencirane oblike celic. V terapevtskem smislu pa so bolj kot slednje pomembne mezenhimske matične celice. Vir teh celic predstavljajo naslednja tkiva: kostni mozeg, koža, mišice, adipozno tkivo in popkovnična kri. Poskusi oblikovanja hrustančnega, kostnega in mišičnega tkiva s pomočjo matičnih celic že dajejo vzpodbudne rezultate, študije na tem področju pa bi bile še toliko bolj uspešne, če bi poznali princip nadzora in vodenja celične diferenciacije (Vacanti in Langer, 1999; Baksh in sod., 2004).

2.2 HRUSTANČNO TKIVO

2.2.1 Splošne in morfološke lastnosti hrustanca ter njegova funkcija

Hrustanec je specializirana vrsta veziva s trdno medceličnino, ki jo tvorijo in vzdržujejo hrustančne celice. Ločimo hialini, elastični in vezivni hrustanec. V nasprotju z drugimi vrstami veziva hrustanec ne vsebuje krvnih in limfnih žil ter živcev. Prehrana poteka z difuzijo iz okolnega veziva oz. iz sinovijske tekočine pri sklepnem hrustancu. Medceličnino hrustančnega tkiva izločajo mlade hrustančne celice (hondroblasti) in zrele hrustančne celice (hondrociti). Osnovne makromolekule, prisotne v medceličnini hrustanca, so različni tipi kolagenov, hialuronska kislina, proteoglikani in manjše količine različnih glikoproteinov. Od vseh treh vrst je hialini hrustanec najbolj razširjen. Najdemo ga na sklepnih površinah premičnih sklepov ter v nosu in grlu, sprednjih delih reber ob stiku reber s prsnico, v sapnikovih obročih in bronhijih (Petrovič in Zorc, 2005).

Znotraj zrelega hrustančnega tkiva obstaja samo en tip visoko specializiranih celic imenovanih hondrociti. Doprinos hrustančnih celic h končnemu volumnu odraslega humanega hrustanca je relativno majhen, običajno 5% ali manj. Kot druge mezenhimske celice se tudi hondrociti obdajo s ekstracelularnim matriksom in le redko tvorijo kontakt s sosednjo celico. Po zaključku razvoja skeleta se hrustančne celice le redko delijo. Skozi življensko dobo sintetizirajo in vzdržujejo zunajcelični matriks, ki daje hrustancu osnovne lastnosti: trdnost, togost, odpornost na raztezanje in sposobnost gladkega drsenja z nizkim koeficientom trenja (DeLee in sod., 2003).



Slika 1: Teritorijska zgradba hialine hrustančevine. Temnejša teritorijska medceličnina ob hondrocitih v lakunah obdanih s kapsulo in svetlejša interteritorijska medceličnina (KU Medical Center. 1996).

Hondrociti se razvijejo iz mezenhimskih celic v zgodnjih fazah razvoja zarodka. V času razvoja postanejo mezenhimske celice na mestih bodočega hrustanca okrogle in se združijo v gosto maso, imenovano hondrofikacijsko središče. Celice se preoblikujejo v hondroblaste in začno v okolico izločati medceličnino. V nadaljnjem razvoju postanejo hondroblasti ujeti v svojo medceličnino v majhnih predelih, imenovanih lakune. Hondroblasti, obdani z medceličnino, so metabolično manj aktivni. Preoblikujejo se v hondrocite, ki pa ohranijo sposobnost delitve (Petrovič in Zorc, 2005).

Sklepni hrustanec je, kljub na prvi pogled enostavni zgradbi, kompleksno organizirano tkivo. Makroskopsko deluje kot gladka steklasta površina, ki s pomočjo sinovialne tekočine omogoča gibanje dveh sklepni površin z minimalnim trenjem poleg tega pa hkrati zmanjšuje tudi obremenitve na subhondralno kost. Lahko prenese obremenitve do petkratne telesne teže. V smeri od kosti proti sklepni površini je viden gradient v velikosti celic, večji hipertrofični hondrociti so v globljih plasteh. Ob kosti je plast kalcificiranega hrustanca (Kregar Velikonja, 2002).

2.2.2 Izvencelični matriks hialinega sklepnega hrustančnega tkiva

Strukturne makromolekule prispevajo od 20 % do 40 % mokre teže hrustanca in vključujejo kolagene, proteoglikane in nekolagenske beljakovine. Vse tipe molekul sestavljajo aminokisline in sladkorji. Različna struktura in organiziranost molekul prispevata k obliki in funkciji hrustančnega tkiva (DeLee in sod., 2003).

2.2.2.1 Kolageni

Kolagen je prevladujoča beljakovina medceličnine. Medcelične fibrile sestavljajo 4 vrste kolagenov. Glavnino fibril gradi kolagen II, v povezavi s kolageni IX, X, XI. Poleg teh molekul kolagena je prisoten še kolagen VI, ki se nahaja ob robu hrustančnih celic in jim omogoča pritrditev na izvencelično ogrodje. Ker so kolagenska vlakna tipov II, IX, X in XI v tolikšni količini zastopani samo v hrustančevini se imenujejo za hrustanec specifična kolagenska vlakna. Daleč najpogostejša oblika je kolagen II (Ross in Pawlina, 2006; Petrovič in Zorc, 2005).

2.2.2.2 Proteoglikani

Osnovna snov hialine hrustančevine vsebuje tri vrste glikozaminoglikanov: hialuronska kislina, hondroitin-sulfat in keratan-sulfat. Hondroitin-sulfati in keratan-sulfati so združeni v beljakovinska jedra v obliki proteoglikanske monomere. Najpomembnejši proteoglikanski monomer v hialini hrustančevini je agrekan. Vsaka molekula vsebuje približno 100 verig hondroitin-sulfata in do 60 molekul keratan-sulfata. Zaradi prisotnosti sulfatnih skupin, ima agrekan velik negativni naboj in tako veliko afiniteto do molekul vode. Hialuronsko-proteoglikanski agregati so vezani na tanka kolagenska vlakna na osnovi elektrostatičnega pritiska ter s pomočjo prečno vezanih glikoproteinov. Hondrociti sintetizirajo tudi druge proteoglikane, vendar v manjših količinah (dekorin, biglikan, fibromodulin) (Ross in Pawlina, 2006; Petrovič in Zorc, 2005).

2.2.2.3 Voda

Kot tudi druga vezivna tkiva vsebuje hrustanec veliko vode. Voda predstavlja od 60 do 80% osnovne mase hrustanca. Večina te vode je tesno vezane na proteoglikanske agregate, kar daje hrustancu prožnost. Nekaj vode je rahlo vezane in preko te poteka difuzija metabolitov od in do hondrocitov. V sklepnem hrustancu potekajo občasne in prostorske spremembe v količini vode. Do sprememb pride pri gibanju sklepa in pri pritiskih na sklep. Visoka stopnja vlažnosti in premiki vode v medceličnini omogočajo prenašanje različnih pritiskov in teže na sklep (Ross in Pawlina, 2006; Petrovič in Zorc, 2005).

2.3 BIOREAKTORJI ZA TKIVNE KULTURE

2.3.1 Splošna dejstva o bioreaktorjih za tkivne kulture

Osnovne zahteve pri oblikovanju bioreaktorjev za gojenje tkivnih kultur sesalčjih celic so visoka stopnja sterilnosti procesa, temperaturna regulacija in prenos kisika ter nizko strižno polje ob mešanju. Ker lahko strižne sile, ki nastajajo ob mešanju, raztrgajo občutljive združbe tkivnih celic, imobilizirajo tkivne celice na različnih nosilcih. Imobilizacija je lahko na statičnih delih ali polnilih bioreaktorja, z naravno ali umetno flokulacijo (glutaraldehyd, 2,4 toluen di-izocianat), ali pa se uporabijo gibljivi nosilci (polisaharidni geli, proteini ali poliakrilati) in porozni inertni materiali (porozno steklo, poliuretani, porozne membrane). Na te nosilce se tkivne kulture vežejo s kovalentno vezjo, adhezijo ali pa se razrastejo v porozni notranjosti nosilca (Berovič, 1996).

Pri gojenju tkivnih kultur je posebnega pomena tudi način prezračevanja. Mehurčki zraka, ki so v običajnih bioreaktorjih, lahko s svojim strujanjem poškodujejo občutljiva celična tkiva, zato bioreaktorji za tkivne kulture pogosto vsebujejo posebne sisteme za prezračevanje, ki ustvarjajo mikromehurčke zraka. Ti temeljijo na različnih poroznih materialih (spin filtri, porozna vlakna itd.) (Berovič, 1996).

Konvencionalne metode raziskav celičnih kultur temeljijo na principu gojenja celic na ravni površini. Ta tradicionalni pristop ne zadosti vsem potrebam celic za uspešno rast in razvoj v tkiva. Ključnega pomena je namreč oblikovanje tridimenzionalne celične kulture, kar pa je nemogoče doseči z gojenjem celic na ravni površini v gojilni posodi. Temeljnega pomena za oblikovanje funkcionalnega tkiva je delovanje mehanskih obremenitev in mehanskega stresa. Vpliv teh obremenitev je uspešen samo v primeru, ko celicam nudimo strukturno oporo v obliki nosilca. Uporaba nosilca omogoča izpolnjevanje začetnih pogojev za pričetek kultivacije pod obremenitvami, ki poteka v bioreaktorju (Bilodeau in Mantovani, 2006)

2.3.2 Bioreaktorji namenjeni gojenju hrustanca

Hrustančne celice živijo v okolju, ki je močno prežeto z mehanskimi silami. Razvoj hrustančnega tkiva je predvsem odvisen od okolja, ki ga obdaja tako *in vivo* kot *in vitro*. Hrustančne celice morajo biti gojene na način, da zadostimo potrebam po kisiku in hranilih ter da odstranujemo odpadne snovi. Za razvoj fenotipsko pravilnega tkiva je potreben vpliv mehanskih sil. V zadnjem času se za gojenje hrustančnega tkiva poslužujemo 4 vrst sil:

- hidrostatski tlak
- direktna kompresija
- okolje z visokim strižnim poljem
- okolje z nizkim strižnim poljem (Darling in Athanasiou, 2003).

Obstajajo številni bioreaktorji namenjeni za tridimenzionalno *in vitro* obliko gojenja hondrocitov. Večina teh sistemov omogoča le omejen prenos hranil in odpadnih

presnovkov skozi gojeno tkivo. Raziskave so pokazale da sedimentacija, ki jo povzroča gravitacija slabo vpliva na rast in razvoj celice kot tudi njenega matriksa. Iz tega razloga je uporaba rotacijskega bioreaktorja zelo primerna, saj omogoča učinkovit prenos snovi in boljše pogoje za razvoj hondrogeneze. Kot stimulant hondrogeneze se omenja tudi tok tekočine gojišča, ki obdaja gojeno kulturo (Marlovits in sod., 2003).

2.3.2.1 Bioreaktorji z mehanskim načinom mešanja

Značilni predstavnik te skupine je mešalni bioreaktor. Bioreaktor je opremljen z mešalom, ki enakomerno porazdeli kisik in hranila v tekočem mediju. Druga različica iste vrste bioreaktorjev je krožni mešalec, ta počasi, brez povzročanja turbulentnega toka meša vsebino petrijevke. V tkivnem inženirstvu pa se pogosto uporabljajo tudi takšni mešalni bioreaktorji, ki imajo namesto klasičnega mešala magnetno palčko katero vrtil magnetno polje (Vunjak-Novaković in sod., 1996).

V biotehnologiji se najpogosteje uporabljajo prav mešalni bioreaktorji, za proizvodnjo hrustanca pa niso zelo primerni. V njih nastajajo visoka strižna polja, pravtako pa je na primeru gojenja hrustanca ugotovljen slab prenos mase, hranil in pH gradienta. Strižno polje je na površini ob mešalu desetkrat višje kot pa kjerkoli drugje v gojišču. To pomeni, da so celice ob mešalu izpostavljene večjim poškodbam kot celice drugje v mediju. Zaradi tega je za uspešno rabo mešalnega bioreaktorja nujno doseči ravnovesje med silami strižnega polja in prenosom hranil ter CO₂ (Freed in sod., 1993; Merchuk, 1990; Darling in Athanasiou, 2003)

2.3.2.2 Perfuzijski bioreaktor

Sistem, ki temelji na pretoku medija skozi nosilec, imenujemo perfuzijski bioreaktor. Deluje na principu pretoka medija, ki teče skozi pore nosilca in ustvarja strižno polje. Takšno okolje vzpodbudi celice k tvorbi izvenceličnega matriksa. Tok gojišča ima tudi lastnost, da celice znotraj nosilca, značilno orientira in sicer v smeri toka. To značilnost lahko učinkovito izrabimo kadar gojimo tkivo s specifično orientacijo celic. Ker se vse celice tekom gojenja orientirajo enako, takšen sistem ni zelo primeren za kultivacijo celic sklepnega hrustanca (Pazzano in sod., 2000).

Perfuzijski bioreaktor je konstruiran tako, da je razmik med nosilcem in steno reaktorja kar se da majhen. Namen je, da čim več medija steče skozi nosilec in ne mimo njega, sicer ni mogoče doseči dobrih rezultatov. Prednost tega bioreaktorja je v učinkovitem vodenju in regulaciji kultivacije. Regulirati je mogoče pretok tekočine, koncentracijo kisika in dotok svežega medija. Slednja lastnost je pomembna iz stališča, da lahko le delno zamenjamo gojitveni medij, torej da mešamo svež medij z izrabljenim. Na tak način ohranimo kemijske signale (rastne faktorje, interleukine), ki jih celice izločajo v gojišče (Moo in sod., 2001).

2.3.2.3 Rotacijski bioreaktor

Posoda rotacijskega bioreaktorja ima obliko valja, pritrjena je na elektromotor, ki posodo vodoravno vrti. Na hrbtni strani posode je silikonska membrana, ki služi kot izmenjevalec plinov. Inokulirane celice oz. celice na nosilcu se v posodi, ki je do vrha napolnjena z gojilnim medijem, prosto vrtijo. Pred zagonom procesa postavimo bioreaktor v CO₂ inkubator, kjer deluje do konca obratovanja (Bilodeau in Mantovani, 2006).

Na gojeni hrustanec vplivata predvsem dve sili, gravitacija in tok medija. Ti dve sili omogočata da celice oz. nosilec v posodi lebdi. Posledica takšnega delovanja sil je nastanek okolja z nizkim strižnim poljem, ki je za gojenje hrustančnih celic zelo primerno. Razvitih je bilo že mnogo rotacijskih bioreaktorjev, nekatere so izpopolnili tako, da so jim dodali perfuzijski sistem in tako tudi zmanjšali možnost kontaminacije, ki nastane pri menjavanju hranilnega medija (Mizuno in sod., 2001; Darling in Athanasiou, 2003)

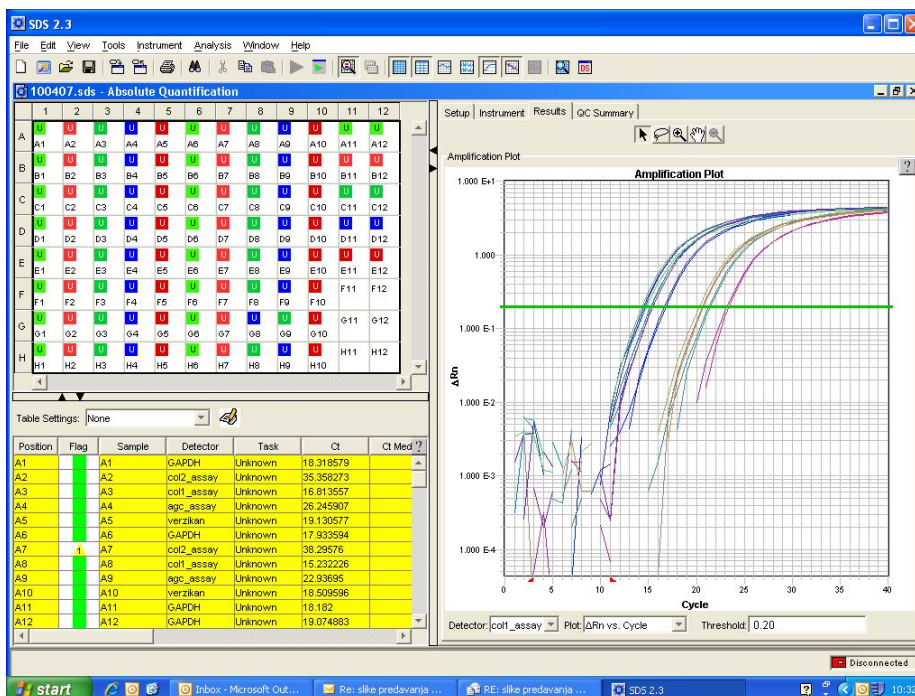


Slika 2: Rotacijski bioreaktor Synthecon (Synthecon, 2000)

2.4 METODE ZA ANALIZO IZRAŽANJA GENOV

Za ugotavljanje stopnje izražanja genov oz. posledične sinteze proteinov obstajajo različne metode kot so npr: imunocitokemija, SDS-PAGE, Western prenos, *in situ* hibridizacije, Northern prenos in reverzna transkripcija s polimerazno verižno reakcijo (RT-PCR). Nobena od naštetih metod ni dovolj občutljiva za detekcijo ekspresije genov z nizko stopnjo izražanja, niti dovolj zanesljiva za kvantifikacijo celotnega območja ekspresij. Bistveni napredek pri študijah ekspresije genov smo dosegli z razvojem reverzne transkripcije s polimerazno verižno reakcijo v realnem času (RT-qPCR).

RT-qPCR je kvantitativna metoda za določanje količine mRNA. Metodo sestavljajo trije koraki: prepis mRNA v cDNA s pomočjo encima reverzna transkriptaza, pomnoževanje produkta z encimom polimeraza ter detekcija in kvantifikacija produktov pomnoževanja. Od osnovne izvedbe reakcije PCR se razlikuje po načinu zaznavanja produkta. Pri osnovni reakciji zaznamo in kvantificiramo produkt šele po končani reakciji, ko krivulja pomnoževanja že doseže svoj vrh. Izvedba PCR v realnem času pa omogoča zaznavanje produkta v eksponentni fazi pomnoževanja. Takšno sledenje nastajanja produkta omogoča uporaba fluorescenčno označene sonde, ki se med reakcijo veže na komplementno mesto na tarčni cDNA med oba začetna oligonukleotida. Fluorescenčne sonde so lahko različno označene. Običajno imajo na 5' koncu vezano fluorescenčno barvilo 6- karboksifluorescein, katerega emisijski spekter duši na 3' koncu vezano barvilo 6- karboksitetrametil-rodamin. Ko poteka prepisovanje, DNA polimeraza odcepi sondo, sprostita se tudi obe barvili, kar onemogoča dušenje fluorescence, ki ga oddaja 6- karboksifluorescein. Emitirana fluorescenca je sorazmerna količini sproščenih sond oz. količini nastalega produkta (Nolan in sod., 2006).



Slika 3:Grafično predstavljen rezultat verižnega pomnoževanja v realnem času (qPCR). Na osi X so prikazani zaporedni cikli pomnoževanja, na osi y pa intenziteta fluorescenčnega sevanja barvila.

2.5 METODE GOJENJA HONDROCITOV

Različne metode gojenja so se razvile z namenom preučevanja hondrocitov pri različnih pogojih ter njihove potencialne uporabe pri zdravljenju bolezni in poškodb hrustanca. Metode gojenja vključujejo enoslojne kulture, tridimenzionalne sisteme, kulture organov in različne modele za transplantacijo (Lin in sod., 2006).

2.5.1 Enoslojna kultura

Enoslojna kultura je nespecifična metoda za gojenje hondrocitov in temelji na postopkih, ki so skupni večini celičnih kultur. Hrustančno biopsijo encimsko obdelamo s kolagenazo tipa II. S tem postopkom omogočimo ločitev izvenceličnega matriksa in hrustančnih celic. Tako pripravljene celice resuspendiramo v tekočem mediju. Medij najpogosteje vsebuje goveji fetalni ali humani serum, askorbinsko kislino, gentamicin (penicilin, streptomycin). Celice gojimo v inkubatorju pri 37°C v atmosferi s 5% CO₂ in vlago, dokler ne prerastejo celotne površine gojilne posode. Ta pojav imenujemo 100% konfluenca. Kulturo iz gojilne posode odstranimo s tripsinom. Potem ko odstranimo tripsin celice prenesemo v večjo gojilno posodo s svežim gojilnim medijem. Tako nastalo hčerinsko kulturo imenujemo prva pasaža (Lin in sod., 2006).

Enoslojna kultura je osnovna metoda razmnoževanja hrustančnih celic. Je ekonomična in tehnično nezahtevna, omogoča pridobivanje velikega števila celic. Slaba stran te metode je dediferenciacija celic in posledično izguba fenotipa. Celice postanejo podobne fibroblastom, izgubijo sposobnost tvorjenja proteoglikanov, prav tako pa ne sintetizirajo več kolagena tipa II, ampak le kolagen tipa I (Lin in sod., 2006).

2.5.2 Tridimenzionalne kulture

Smisel gojenja hrustančnih celic v tridimenzionalni kulturi je stabilizacija fenotipa. Tehnik gojenja je več, vsem pa so skupni nosilci na/v katere celice nasadimo (Lin in sod., 2006).

Težava pri nosilcih je otežkočena difuzija kisika, hranil in signalnih molekul v osrednji del konstrukta. Problem je tudi počasna delitev celic v primerjavi z enoslojno kulturo, kar je verjetno posledica podaljšanja interfaze na naravno dolžino. V enoslojni kulturi je namreč interfaza bistveno skrajšana zaradi prisotnosti seruma v gojilnem mediju, ki pospešuje proliferacijo celic, kar je obenem razlog za dediferenciacijo (Strehl in sod., 2002).

2.5.3 Peletna kultura

Metoda temelji na odkritju, da hondrociti za vzdrževanje hondrocitnega fenotipa zahtevajo visoke koncentracije celic ter da se ob prehodu iz nižje v višjo koncentracijo celic v okolju le-ti rediferencirajo. Stabilizacija fenotipa je dosežena že pri nasajevanju 4×10^5 celic /cm². Študije so pokazale, da hondrociti, gojeni v obliki peletne kulture, kažejo podobnosti v razporeditvi celc, sestavi izvenceličnega matriksa in ultrastrukturi tkiva nativnega hrustanca (Schulze-Tanzil, 2002; Zhang in sod., 2004)

2.6 NOSILCI KI SE UPORABLJAJO V TKIVNEM INŽENIRSTVU

2.6.1 Funkcija in namen uporabe nosilcev

Kot smo že omenili je bistvo tkivnega inženirstva priprava biološkega pripravka namenjenega za obnovo prizadetega tkiva ali organa. Takšni pripravki so lahko samo celice ali pa celice, nasajene na določen nosilec. Funkcija nosilca je mehanska opora celicam in ustvarjanje ustreznega tridimenzionalnega okolja, ki spodbuja izražanje specifičnih genov.

Dober nosilec naj bi imel naslednje lastnosti:

- združljivost s tkivom v katero se vnaša (biokompatibilnost)
- visoka poroznost in prepustnost za difuzijo hranil in plinov
- površina primerna za pritrditev celic
- vzpodbuja sintezo izvenceličnega matriksa
- omogoča razmnoževanje in diferenciacijo
- biomehanske lastnosti podobne izhodnemu tkivu (Yannas, 2004).

Materiale, ki se uporabljajo kot nosilci za sesalske celice delimo na sintetične in naravne.

2.6.2. Sintetični polimerni materiali

Mnogo pristopov v tkivnem inženirstvu sloni na sintetičnih biorazgradljivih polimerih. Polimerni materiali imajo dobre mehanske lastnosti, oblikovati jih je mogoče tako, da se njihova struktura ne poruši tekom oblikovanja novega tkiva. Prihod novih sintetičnih materialov in razvoj tehnologij procesiranja le-teh je/bo omogočil nadaljni razvoj tkivno-inženirskih pripravkov v smeri oblikovanja krvnih žil, črevesja, hrustanca in kosti ter srčnih zaklopk. Pomembna predstavnika sintetičnih nosilcev sta lakto-glikolna kislina in poliakrilonitril-polivinil klorid (Vacanti in Langer, 1999).

2.6.2.1. Polilaktična in poliglikolna kislina

Poliglikolna in polilaktična kislina ter njuni kopolimeri so trenutno najširše uporabljeni sintetični materiali v tkivnem inženirstvu. Po svojih kemijskih lastnostih je poliglikolna kislina linearen alifatski poliestar. Ima visoko temperaturo tališča v organskih topilih pa se slabo topi. Spekter uporabe obeh snovi se razširi kadar ju povežemo v kopolimer. Zaradi polilaktične kisline, ki jo takšni kopolimer vsebuje je omejena vezava vode obenem pa je upočasnjena tudi hidroliza nosilca. Produkti polilaktične in poliglikolne kisline so biološko

razgradljivi, znotraj živalskega organizma razpadejo na manjše delce, monomere, ki se nato odstranijo iz telesa po običajnih poteh presnavljanja. Spojini se smatrata za varni, netoksični in biokompatibilni (Mendelson in Frederick, 2006).

2.6.3. Naravni materiali

Naravne nosilce tvorijo običajno čiste komponente izvenceličnega matriksa kot so npr.: kolagen, fibrin, itd. Razen tega je mogoče kot naraven nosilec uporabiti tudi tkivo, iz katerega se s pomočjo encimskih postopkov odstrani celice. To se naredi zato, da se zmanjša verjetnost imunskega odgovora in kalcifikacije. Tako pripravljen nosilec omogoča dobro pritrditev celic poleg tega pa obdrži večino mehanskih in strukturnih lastnosti (Mendelson in Frederick, 2006).

2.6.3.1 Agaroza in alginat

Agaroza in alginat sta polisaharida, ki ju pridobivamo iz morskih alg. Tvorita hidrogele, ki omogočajo enakomerno porazdelitev celic po celem nosilcu, mogoče pa ju je uporabiti tudi kot nosilec za injiciranje. Tri dimenzionalno okolje hidrogela simulira naravno okolje hondrocitov v hrustančnem tkivu ter s tem stimulira oz. ohranja hrustančni fenotip celic.

Alginati so linearni nerazvejani polimeri sestavljeni iz manuronskih in glukuronskih kislinskih enot. Ob prisotnosti dvovalentnih kationov (predvsem se uporablja Ca^{2+}) polimerizirajo in tvorijo gel. (Chaplin M., 2008)

Agaroza je, zaradi hidroksilnih skupin, v vodi topna snov. Dve verigi agaroze se med seboj povežeta z vodikovimi vezmi in tvorita dvojno vijačnico. Pri nizkih temperaturah tvori termično reverzibilni gel. Agarozni hidrogeli se široko uporabljajo v tkivnem inženirstvu. Omogoča rast celicam in tkivom v obliki tri dimenzionalne suspenzije. Še posebej so primerni za gojenje hrustančnih celic. Vpliv agaroze na celice se kaže tako, da stimulira tvorbo kolagena II in proteoglikanov. Slaba lastnost agaroze je počasna resorbilnost, poleg tega pa jo telo lahko prepozna kot tujek kar sproži celični odgovor (Frenkel in Di Cesare, 2004).

2.6.3.2. Kolageni

Kolageni so fibrilarni proteini in so prisotni v vseh živalih. Tvorijo nitaste preplete, ki služijo kot ogrodje tkivom in organom. Zaradi svojih lastnosti jih s pridom uporabljamo v tkivnem inženirstvu. Še posebej je tak nosilec primeren za gojenje hrustančnih celic saj jim omogoča uspešno pripenjanje. Kolagen se kot nosilec uporablja že desetletja in sicer za karakterizacijo hrustančnih celic, matičnih celic ter drugih živalskih celic. Frenkel in Di Cesare poročata o spodbudnih rezultatih prenosa kolagenskega nosilca s hondrociti v kunce. Hondrociti so tvorili zunajcelični matriks, ki je bil po mehanskih in biokemijskih lastnostih zelo podoben hialinemu hrustancu (Frenkel in Di Cesare, 2004)

2.6.3.3.Hitozan

Hitozan je polisaharid, ki ga s pomočjo hondroitin sulfata zamrežimo tako, da nastane hidrogel. Takšni hidrogeli služijo kot prenašalci za termično občutljive celice. Mogoče jih je ubrizgati kot tekočino saj tvorijo gel že pri telesni temperaturi. Hidrogeli hitozana se uspešno uporabljajo kot medji za prenos rastnega faktorja do hrustančnih celic (Frenkel in Di Cesare, 2004).

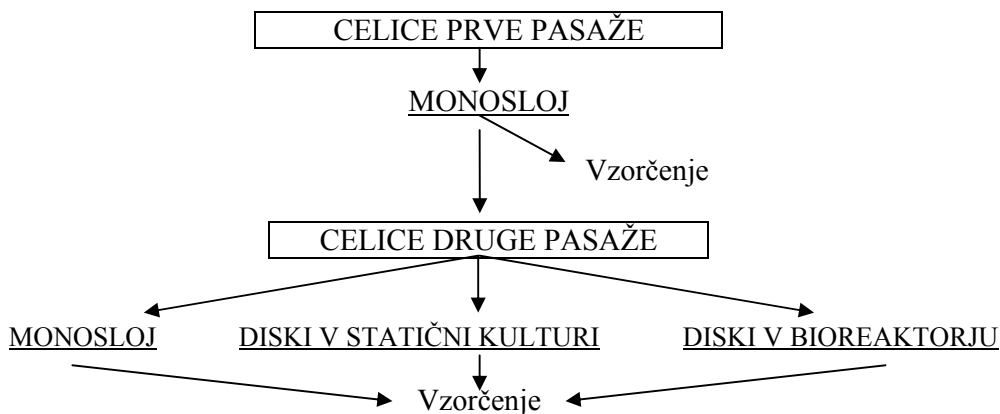
3 MATERIAL IN METODE

Na osnovi delovne hipoteze bomo preučevali vpliv rotacijskega bioreaktorja in tridimenzionalnega nosilca iz alginat-agaroznega hidrogela na spremembo fenotipskih lastnosti človeških hrustančnih celic.

3.1 POTEK POSKUSA

Iz zamrznjenih vzorcev primarnih kultur hondrocitov štirih bolnikov smo pripravili enoslojne kulture. Nasaditvena gostota celic je bila 3000 celic/cm². Celice iz primarnih kultur smo gojili do 80% konfluente. 80 % konfluenco definiramo kot 80 % prerast dna gojilne posode. Po doseženi 80 % konfluenci smo celice, s pomočjo tripsina, odlepili z dna gojilne posode in jih nato nasadili v novo gojilno posodo kot celice prve pasaže. Po doseženi 80% konfluenci smo celice ponovno odlepili s pomočjo tripsina ter jih prešteli s pomočjo hemocitometra in svetlobnega mikroskopa.

V naslednjem koraku smo posameznemu vzorcu iz prve pasaže odvzeli 250 000 celic za izolacijo RNA. Celice iz prve pasaže smo nasadili v diske iz mešanice alginata in agaroze in v gojilne posode za enoslojno rast druge pasaže. Koncentracija celic v disku je bila 10×10^6 celic/ml gela. Celice v diskih smo gojili v rotacijskem bioreaktorju in v gojilni posodi (statična kultura). Gojilni medij smo menjavali dvakrat na teden. Iz vzorcev enosloja druge pasaže in posameznih diskov smo odvezemali vzorce celic za izolacijo RNA. Po 28 dneh inkubacije smo analizirali živost celic v diskih iz gela. Živost celic v gelu smo testirali z barvanjem in sicer z etidjevim homodimerom in kalceinom AM. Etidjev homodimer obarva mrtve celice, kalcein AM pa žive.



Slika 4: Shema poteka gojenja hondrocitov

Iz vzorcev smo s pomočjo sestava GenElute Mammalian Total RNA Kit (Sigma, ZDA) izolirali celotno RNA. Potem smo prepisali RNA v cDNA s pomočjo encima reverzna transkriptaza ter cDNA analizirali z metodo PCR v realnem času (kvantitativni PCR). Zanimalo nas je izražanje genov, ki kodirajo gradbene enote, specifične za sklepni izvencelični matriks (kolagen II in agrekan), in genov, ki kodirajo gradbene enote, specifične za fibroblastni tip hrustančnega tkiva (kolagen I in verzikan). Izražanje genov smo analizirali s programi SDS 2.1 (Applied Biosystems, ZDA) in Microsoft Excel

3.2 POSTOPEK GOJENJA CELIČNIH KULTUR

3.2.1 Uporabljene kemikalje, potrošni material in laboratorijska oprema

3.2.1.1 Kemikalje

- D-MEM/F-12 (1:1) (Gibco, ZDA)
- DMSO (Sigma, ZDA)
- CaCl_2 (25 mM) (Merck, Nemčija)
- Humani serum (Zavod RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani in Educell d.o.o.)
- Fungizon (250 $\mu\text{g/ml}$) (Gibco, ZDA)
- Gentamicin (50 $\mu\text{g/ml}$) (Gibco, ZDA)
- HBSS (Gibco, ZDA)
- Hidrogel (mešanica 1 % alginata in 1,5 % agaroze; Lot: GEL 210604) (TBF, Francija)
- Tripansko modrilo (Gibco, ZDA)
- Trypsin/EDTA (0,5 g tripsina, 0,2 g EDTA, 0,85 g NaCl/1) (Sigma, ZDA)

3.2.1.2 Droben laboratorijski material

- Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- Celična sita 40 μm (Falcon, ZDA)
- Viala za zamrzovanje (Costar, ZDA)
- Hemocitometer – Neubauerjeva komora (Sigma, ZDA)
- Injekcijske brizge 20 in 50 ml (Tyco Kendall, Združeno kraljevstvo V. B. in S. I.)
- Krovna stekla
- Mikrocentrifugirke 1,5 ml (Costar, ZDA)
- Pinceta
- Pipete za enkratno uporabo 2, 5, 10 in 50 ml (Costar, ZDA)
- Pipetni nastavki 1-10 μl , 10-100 μl in 100-1000 μl (Costar, ZDA)
- Gojilne plošče s 6 in 24 luknjami (TPP, Švica)
- Polipropilenske centrifugirke 15 in 50 ml (Falcon, ZDA in TPP, Švica)
- Polipropilenske petrijevke 35 mm (TPP, Švica)
- Posode za gojenje celičnih kultur 25 cm^2 , 150 cm^2 , 300 cm^2 (Costar, ZDA)
- Posoda za počasno zamrzovanje celic MrFrosty (Nalgene, ZDA)
- Skalpel
- Spatula
- Sterilizacijski filter Minisart 0,2 μm (Sartorius, Nemčija)
- Stojalo za centrifugirke in mikrocentrifugirke

3.2.1.3 Laboratorijska oprema

- Centrifuga (Tehtnica, PLC 322, Slovenija)
- CO₂ inkubator (HeraCell, Heraeus, Nemčija)
- Digitalni fotoaparat Nikon E900 (Nikon, Japonska)
- Rotacijski stresalnik (MS2 Minishaker, IKA, ZDA)
- Hladilnik (+4 °C) in zamrzovalnik (-20 °C) (Electrolux, Švedska)
- Invertni mikroskop TMS (Nikon, Japonska)
- Fluorescenčni mikroskop Eclipse TE300 (Nikon, Japonska)
- Pipetor za pipete, Pipetboy (Integra, Švica)
- Posoda s tekočim dušikom (LocatorPlusJr., Barnstead|Thermolyne Corporation, ZDA)
- Grelni blok (Biometra, Nemčija)
- Zamrzovalnik (-80 °C) (HetoHolten, Danska)
- Zaščitna mikrobiološka komora (Iskra Pio, Slovenija)
- Vodna kopel (GFL, Nemčija)
- Rotacijski bioreaktor RCCS-4D (Synthecon, ZDA)

3.2.2 Priprava primarne kulture hondrocitov iz zamrznjenih vzorcev celic

3.2.2.1 Odmrzovanje vzorca

Epruveto z zamrznjenimi hondrociti smo vzeli iz posode s tekočim dušikom in jo odtalili pri 37 °C. Med odtaljevanjem smo celicam s pipeto dodajali serum in jih predstavljali v 50 ml centrifugirko. S hitrim delom in dodajanjem seruma preprečimo toksično delovanje dimetilsulfoksida (DMSO). Suspenziji celic smo nato dodali 10 ml gojilnega medija in homogenizirali suspenzijo s stresanjem na rotacijskem stresalniku. V 20 µl vzorca smo prešteli celice in izračunali skupno število celic (Freshney, 2005).

Sestava gojilnega medija za hondrocite:

- 15% humanega seruma,
- 1 µg/ml gentamicina,
- 8 µg/ml fungizona
- D-MEM/F12.

3.2.2.2 Priprava primarne kulture

Odmrznjeno suspenzijo hondrocitov smo centrifugirali 5 minut pri 1800 rpm pri sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in celice ponovno resuspendirali v 15% serumskem gojišču s pomočjo rotacijskega stresalnika. Tako pripravljene celice smo prenesli v gojilno posodo s površino 300 cm². Pred vnosom celične suspenzije smo v posodo dodali 40 ml 15% serumskega gojišča. Gojilno posodo smo označili in površinsko očistili, nato smo jo prenesli v CO₂ inkubator (Freshney, 2005).

3.2.3 Nasaditev hondrocitov v prvo pasažo

3.2.3.1 Tripsinizacija

Ko smo pod invertnim mikroskopom opazili 80% preraščenost dna gojilne posode, smo celične kulture obdelali s tripsinom. Tripsin je encim, ki pomaga odlepiti celice iz dna gojilne posode.

Iz gojilne posode smo najprej odstranili izrabljen gojilni medij, nato smo pritrdjene celice spirali s sterilno raztopino za spiranje HBSS. Ko smo odstranili HBSS, smo dodali 10 ml 0,5% raztopine tripsin/EDTA. Postopek tripsinizacije je trajal 3 minute pri 37 °C v CO₂ inkubatorju. Po inkubaciji smo celice skupaj s tripsinom odstranili in jih shranili v centrifugirki. Gojilno posodo smo sprali s 15% serumskim gojiščem, ki smo ga po spiranju dodali v centrifugirko s celicami. Serum deluje kot inhibitor tripsina. Suspenzijo celic smo centrifugirali 5 minut pri 1800 rpm pri sobni temperaturi. Supernatant smo odlili in ponovili spiranje. Po spiranju smo iz suspenzije celic odvzeli 20 µl vzorca in prešteli celice (Freshney, 2005).

3.2.3.2 Štetje celic s hemocitometrom

Celice smo prešteli po vsaki tripsinizaciji. Iz suspenzije celic smo odvzeli 20 µl vzorca in mu dodali enak volumen tripanskega modrila. Tripansko modrilo vstopa samo v mrtve celice, ki se zato obarvajo modro, tako jih lahko ločimo od živih celic, ki ostanejo neobarvane. 20 µl mešanice smo s pipeto prenesli pod krovno steklo hemocitometra in prešteli žive in mrtve celice v obeh poljih. Povprečno število živih oz. mrtvih celic v obeh poljih smo delili z 9 (število kvadratkov v posameznem polju) in dobili povprečno število živih oz. mrtvih celic v kvadratu (Freshney, 2005).

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

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

N = skupno število živih/mrtvih celic v suspenziji

n = povprečno število prešteti živih/mrtvih celic v kvadratu

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

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

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

3.2.3.3 Nasaditev celic v prvo pasažo

V 300 cm² posodo za gojenje smo nasadili 1 x 10⁶ celic, dodali smo jim 40 ml 15% serumskega gojišča. Gojilno posodo smo dobro zaprli, označili in površinsko očistili pred vnosom v CO₂ inkubator (Freshney, 2005).

3.2.3.4 Shranjevanje celic v tekočem dušiku

Celice, ki jih po tripsinizaciji nismo potrebovali za nadaljnje poskuse, smo zamrznili po naslednjem postopku. Najprej smo ugotovili skupno število celic v suspenziji in se odločili za število celic, ki jih želimo zamrzniti v posamezni viali za zamrzovanje. Nato smo suspenzijo razdelili v centrifugirke z enakim številom celic in jih centrifugirali 5 minut pri 1800 rpm pri sobni temperaturi. Ko smo odstranili supernatant smo v celično usedlino ob steni počasi (zaradi toksičnega učinka dimetilsulfoksida na celice) dodali 2 ml medija za zamrzovanje. Mešanico smo prenesli v ohlajene vialice za zamrzovanje in jih postavili v posodo za počasno zamrzovanje MrFrosty. Po 24-urni inkubaciji na -80°C smo celice prenesli posodo s tekočim dušikom (-196°C) (Freshney, 2005).

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

- 1 ml seruma,
- 0,75 ml D-MEM/F-12,
- 0,25 ml DMSO.

3.2.4 Nasaditev celic v drugo pasažo, diske iz hidrogela ter zagon bioreaktorja

Gojenje hondrocitov v prvi pasaži smo zaključili, ko je bila dosežena 80 % konfluenca. Opravili smo tripsinizacijo (postopek je opisan v poglavju 3.2.3.1) in prešteli skupno število živih celic (postopek je opisan v poglavju 3.2.3.2).

Od skupnega števila živih celic smo jih shranili približno 250 000 za nadaljnje analize (postopek je opisan v poglavju 3.2.3.4).

Približno 25 000 celic smo odvzeli od posameznega vzorca in jih nasadili v gojilne posode s površino 25 cm^2 – druga pasaža. Ustrezen volumen vzorca prve pasaže smo centrifugirali 5 minut pri 1800 rpm in sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo supernatant odlili, celično usedlino pa s pomočjo rotacijskega mešala resuspendirali v 4 ml gojilnega medija. Suspenzijo smo nato prenesli v gojilno posodo, v katero smo pred tem dodali 5 ml gojilnega medija. Posodo smo zaprli, površinsko očistili in prenesli v CO_2 inkubator (Freshney, 2005).

Za preostalo število celic smo pripravili alginat agarozne diske. Suspenzije celic smo razdelili v centrifugirke. V vsaki centrifugirki je bilo takšno število celic, ki ga potrebujemo za posamezni disk. Celice smo centrifugirali 5 minut pri 1800 rpm in sobni temperaturi in odlili supernatant. Celično usedlino smo nato resuspendirali na rotacijskem mešalu. Hidrogel smo segreli v termobloku pri 90°C dokler se ni utekočinil. Počakali smo, da se je hidrogel ohladil na 37°C in mu dodali celice. Mešali smo previdno in počasi, da ni prišlo do tvorbe mehurčkov. Nato smo ustrezne volumne gela prenesli v luknje silikonskega modela. Hidrogel smo inkubirali 10 minut v hladilniku (10°C), da se je strdil, nato smo diske prekrili s 25 mM raztopino CaCl_2 in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Po 4 diske naenkrat smo nato prenesli v petrijevko in inkubirali 24 ur v 15% serumskem gojišču s 5 mM raztopino CaCl_2 . Pred uporabo bioreaktorja smo bioreaktorske

posode napolnili z D-MEM/F-12 in jih inkubirali 24 ur pri 37°C. Diske smo pred prenosom v petrijevke in bioreaktor predhodno spirali z gojilnim medijem. V vsako bioreaktorsko posodo in petrijevko smo dali po dva diska. Bioreaktorsko posodo smo napolnili do vrha, tako da ni bilo prisotnih mehurčkov zraka. Ob zagonu bioreaktorja smo bili pozorni, da je hitrost vrtenja omogočala diskom lebdenje v gojilnem mediju. Preden smo petrijevke in bioreaktorske posode prenesli v CO₂ inkubator, smo jih površinsko očistili (Freshney, 2005).

3.2.5 Dohranjevanje celičnih kultur hondrocitov

Celične kulture prvih pasaž, drugih pasaž in diskov iz gela smo dohranjevali vsak tretji dan. Izrabljen gojilni medij smo s pipeto odstranili iz gojilne posode oz. iz bioreaktorske posode in ga nadomestili z ustreznim volumnom svežega gojilnega medija, predgretega na 37 °C. Primarne celične kulture, prve pasaže in druge pasaže smo gojili do dosežene 80 % konfluente, za diske iz gela pa je bil čas gojenja 14 oz. 28 dni (Freshney, 2005).

3.2.6 Odvzem vzorcev za nadaljnje analize

Za izolacijo RNA smo pri vzorcu vsakega bolnika shranili:

- vzorec enoslojne kulture po tripsinizaciji celične kulture prve pasaže,
- vzorec enoslojne kulture po tripsinizaciji celične kulture druge pasaže,
- celotne diske iz gela.

Celice enoslojnih kultur smo centrifugirali 5 minut pri 1800 rpm pri sobni temperaturi ter odlili supernatant. Diske smo s pomočjo spatule prenesli v petrijevko. Iz dveh diskov iz gela smo odrezali po eno tanko rezino vzorca za določanje živosti celic. Preostanek diskov smo prenesli v mikrocentrifugirke.

Vzorci za izolacijo RNA smo prenesli v mikrocentrifugirke in dodali:

- v celične usedline vzorcev enoslojnih kultur: 250 µl lizirajočega pufra in 2,5 µl β-merkaptotetanol,
- v vzorec diskov iz gela: 500 µl lizirajočega pufra in 5 µl β-merkaptotetanol.

Tako pripravljene vzorce smo shranili v zamrzovalniku pri -80 °C do izolacije RNA.

3.3 KVALITATIVNO DOLOČANJE ŽIVOSTI HONDROCITOV V DISKIH IZ GELA

3.3.1 Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema

3.3.1.1 Kemikalije

- Kalcein AM (4 mM) (Molecular Probes, ZDA)
- Etidijev homodimer-1 (2 mM) (Molecular Probes, ZDA)
- PBS

3.3.1.2 Droben laboratorijski material

- Pipete za enkratno uporabo 5 in 10 ml (Costar, ZDA)
- Gojilne plošče s 6 in 24 luknjami (TPP, Švica)
- Skalpel
- Spatula

3.3.1.3 Laboratorijska oprema

- CO₂ inkubator (Jouan IG 150, ZDA)
- Digitalni fotoaparat Nikon E900 (Nikon, Japonska)
- Fluorescenčni mikroskop Eclipse TE300 (Nikon, Japonska)
- Invertni mikroskop TMS (Nikon, Japonska)
- Pipetor za pipete, Pipetboy (Integra, Švica)
- Zaščitna mikrobiološka komora (Iskra Pio, Slovenija)

3.3.2 Barvanje rezin gela z barvilom kalcein AM in etidijevim homodimerom (EthD-1)

Vzorca dveh diskov smo sprali s pufrom (PBS) in ju narezali na tanke rezine. Rezine diska smo prenesli v gojilno posodo s 24-imi luknjami. Vzorce smo prelili s 500 µl pripravljenega barvila. Barvilo smo pripravil tako, da smo k 1 ml PBS dodali 2 µl EthD-1 in 0,5 µl kalceina AM. Rezine prekrte za barvilom smo nato inkubirali 40 minut v temnem prostoru. Po inkubaciji smo rezine sprali s PBS in vzorca opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom.

Kalcein AM je barvilo, ki prehaja skozi celično membrano. Celične esterase preoblikujejo nefluorescirajoči kalcein AM v fluorescirajoči kalcein, ki fluorescira pri valovni dolžini od 495 nm do 515 nm. Žive celice svetijo zeleno. Mrtve celice, ki nimajo aktivnih esteraz obarvamo z EthD-1, ki prehaja samo poškodovano celično membrano. Veže se na nukleinske kisline in fluorescira svetlo rdeče pri valovni dolžini od 495 nm do 635 nm (Papadopoulos, 1994).

3.4 KVANTITATIVNO DOLOČANJE IZRAŽANJA SPECIFIČNIH GENOV V VZORCIH ENOSLOJNIH IN TRIDIMENZIONALNIH KULTUR

3.4.1 Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema

3.4.1.1 Kemikalije

- 70 % etanol, pripravljen iz 96 % (Pharmachem, Slovenija)
- DEPC (Sigma, ZDA)
- GenElute™ Mammalian Total RNA Kit (Sigma, ZDA)
- High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, ZDA)
- Osnovna zmes - TaqMan® Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems, ZDA)
- Prečiščena voda (Ph. Eur. 4th; Zavod RS za transfuzijsko medicino)
- Začetni oligonukleotidi in sonde za človeški gen kolagen I, kolagen II, agrekan, verzikan in GAPDH (TaqMan® Gene Expression Assays-Assays on Demand™, Applied Biosystems, ZDA)

3.4.1.2 Droben laboratorijski material

- Aluminijska folija
- Folija za lepljenje optične reakcijske ploščice (ABI Prism Optical Adhesive Covers) (Applied Biosystems, ZDA)
- Luknjičasto pokrivalo za optično reakcijsko ploščico
- Mikrocentrifugirke (Eppendorf, Nemčija)
- Optična reakcijska ploščica s 96 luknjicami (ABI Prism 96- Well Optical Reaction Plate) (Applied Biosystems, ZDA)
- Nastavki za pipete; 10, 100 in 1000 µl (Costar, ZDA)
- Stojalo za centrifugirke in mikrocentrifugirke

3.4.1.3 Laboratorijska oprema

- Aparat ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, ZDA)
- Centrifuga 5804 R (Eppendorf, Nemčija)
- Centrifuga (Tehtnica, PLC 332, Slovenija)
- Električni stresalnik, vortex (MS2 Minishaker IKA, ZDA)
- Grelni blok (Eppendorf, Nemčija)
- Kadička z ledom
- Spektrofotometer BioPhotometer (Eppendorf, Nemčija)
- Zamrzovalnik (-80 °C) (HetoHolten, Danska)
- Zamrzovalnik (-20 °C) (Electrolux)

3.4.2 Izolacija RNA

RNA smo izolirali po navodilih iz sestava GenElute™ Mamalian Total RNA Kit (Sigma). Mikrocentrifugirko s celičnim lizatом smo vzeli iz zamrzovalnika in jo pustili na sobni temperaturi do popolnega odtajanja. Lizat celic iz gelov smo prefiltrirali preko filtracijske kolone. Lizatu smo dodali enak volumen 70 % raztopine etanola (250 µl pri vzorcih monosloja oz. 500 µl pri vzorcih gela) in premešali na rotacijskem mešalu. Lizat smo prenesli na kolono za vezanje in centrifugirali 15 sekund pri največjem številu obratov in pri sobni temperaturi. Kolono smo prenesli v novo zbiralno mikrocentrifugirko in nanesti 500 µl prve raztopine za spiranje. Po 15 sekundnem centrifugiranju pri največjem številu obratov smo kolono prenesli v novo zbiralno mikrocentrifugirko in dodali 500 µl druge raztopine za spiranje (predhodno razredčene s 70% etanolom). Centrifugirali smo 15 sekund pri največjem številu obratov. Spiranje z drugo raztopino za spiranje smo še enkrat ponovili z enakim volumnom in nato centrifugirali 2 minuti pri največjem številu obratov. Vezavno kolono smo prenesli v novo zbirno mikrocentrifugirko in odpipetirali 50 µl raztopine za izpiranje. Nato smo centrifugirali 1 minuto pri najvišjih obratih in zbrali eluat, ki vsebuje izolirano RNA. Čistost in koncentracijo izolirane RNA smo preverili na spektrofotometru s preverjanjem razmerja absorbanc pri valovnih dolžinah vpadne svetlobe 260 nm in 280 nm. RNA smo shranili pri -80 °C do uporabe (Frederick, 1999; Farrell, 1998; Sambrook, 2001).

3.4.3 Prepis RNA v cDNA

RNA, ki smo jo izolirali smo prepisali v cDNA, in sicer po navodilih iz sestava High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, ZDA). RNA smo vzeli iz zamrzovalnika in prenesli v posodo z ledom. Po potrebi smo vzorce redčili s prečiščeno vodo z 0,1 %DEPC. Kjer je bilo možno, smo za reakcijo vzeli 1,5 µg RNA.

Transkripcijsko mešanico smo pripravili glede na število vzorcev iz naslednjih reagentov (za en vzorec):

- 5 µl 10x pufra za obratno transkripcijo,
- 2 µl 25x dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP),
- 5 µl 10x naključnih začetnih oligonukleotidov,
- 2,5 µl RNaznega inhibitorja (1 U/µl),
- 2,5 µl encima MultiScribe,
- 1,5 µg (ali manj) RNA,
- Do 50 µl prečiščena voda z 0,1% DEPC.

Mešanico smo inkubirali v grelnem bloku: deset minut pri 25 °C, nato 120 min pri 37 °C. Vzorec cDNA smo shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C (Brown, 2002).

3.4.4 Verižna reakcija pomnoževanja v realnem času (qPCR)

Mikrocentrifugirke z vzorci cDNA smo vzeli iz zamrzovalnika in prenesli v majhno kad napolnjeno z ledom. Vzorce smo redčili s destilirano in deionizirano vodo v razmerju 1:1.

V mikrocentrifugirkah smo za vsak gen posebej (kolagen I, kolagen II, agrekan, verzikan in GADPH) zmešali ustrezno količino reagentov in pripravili reakcijsko mešanico. Sonde in začetne oligonukleotide smo med pripravo reakcijske zmesi zaščitili pred svetlobo s pomočjo aluminijaste folije. Sestava reakcijske mešanice za 1 vzorec:

- 12,5 µl osnovne zmesi-TaqMan® Universal PCR MasterMix,
- 1,25 µl začetnih oligonukleotidov in sonde TaqMan® Gene Expression Assays-Assays on Demand™
- 6,25 µl prečiščene vode,
- 5 µl vzorca cDNA.

V optično ploščo s 96-imi luknjami smo odpipetirali po 20 µl mešanice, nato pa dodali še 5 µl vzorca. Kot negativno kontrolo mešanice za posamezne gene smo v štiri luknjice namesto cDNA dodali po 5 µl prečiščene vode. Optično ploščico smo zalepili s samolepilno folijo in jo centrifugirali 2 minuti pri 1000 x g pri sobni temperaturi. Potem smo jo prekrili z luknjičastim pokrivalom in vstavili v aparat ABI Prism 7900HT. V računalniškem programu SDS 2.1 smo izbrali sonde, volumen reakcije in število ciklov. Proces verižne reakcije pomnoževanja je potekal v treh fazah: 2 minuti pri 50 °C, 10 minut pri 95 °C in 40 ciklov pomnoževanja, ki so bili sestavljeni iz 15-ih sekund pri 95 °C in 1 minute pri 60 °C.

Po končani reakciji smo meritve analizirali s pomočjo programov SDS 2.1 in Microsoft Excel. Za vsak vzorec cDNA smo določili vrednost Ct, ki je obratno sorazmerna začetni koncentraciji cDNA in predstavlja zaporedni cikel, pri katerem krivulja pomnoževanja (intenziteta fluorescence) preseže določen nivo. Ct-vrednost primerjalnega gena GADPH smo odšteli od Ct-vrednosti posameznega gena (ΔCt). Relativni nivo izražanja vsakega gena, ki kaže, ali je preučevani gen izražen v večjem ali manjšem obsegu kot primerjalni, smo potem računali po relaciji:

$$\text{Ekspresija} = 2^{\text{abs}(\Delta Ct)} \dots\dots\dots(2)$$

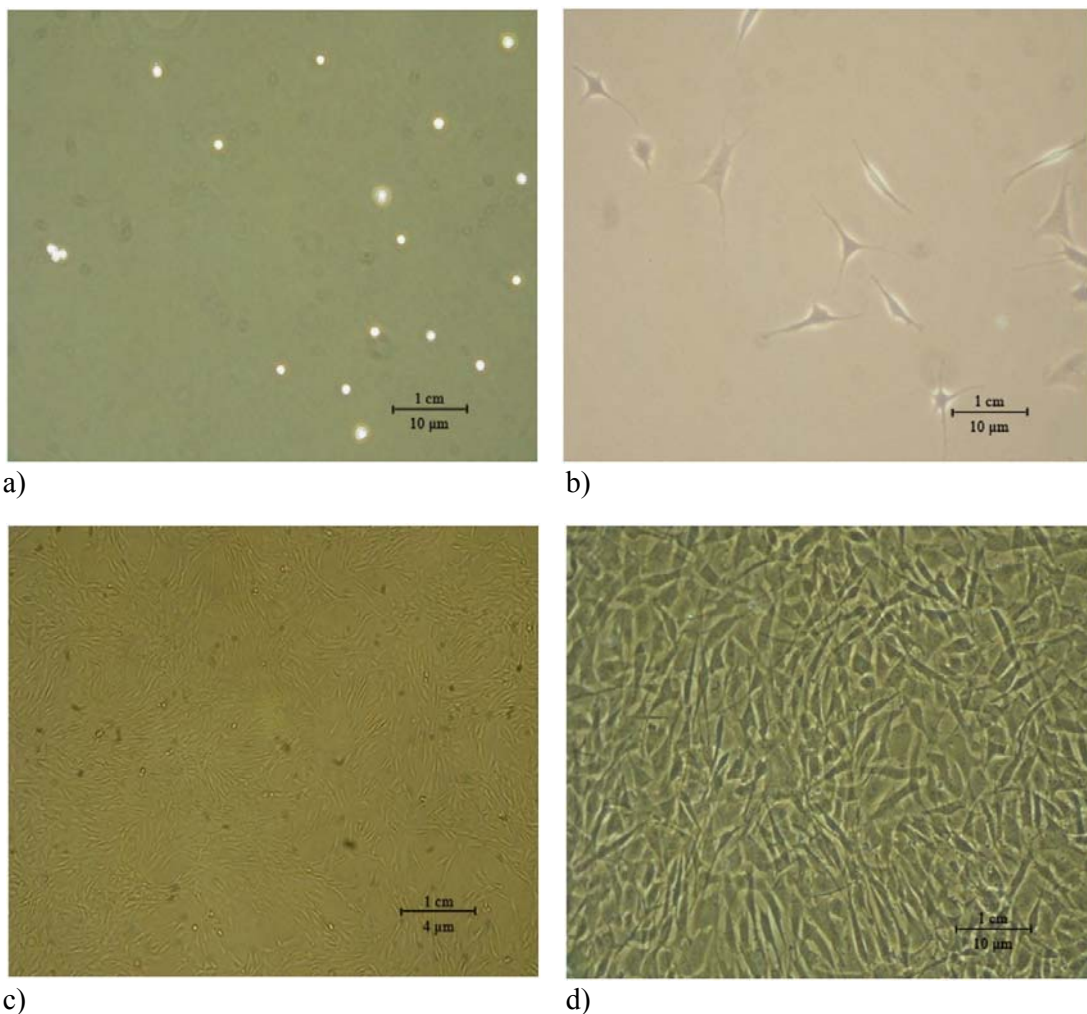
Da lahko posamezne meritve primerjamo med seboj, smo vrednosti ekspresije normalizirali (Higuchi in sod., 1993).

4 REZULTATI

Skladno z delovno hipotezo ki pravi, da gojenje hrustančnih celic v tridimenzionalnem okolju zavre proces dediferenciacije do katerega pride tekom gojenja v enoslojni kulturi in do določene mere povrne primarne lastnosti, smo preučevali vpliv alginat-agaroznega hidrogela in rotacijskega bioreaktorja na izražanje tistih genov, ki so specifični za hialini sklepni (kolagen II, agrekan) oz. fibrozni tip (kolagen I, verzikan) hrustančnega tkiva. Tekom gojenja smo spremljali morfologijo celic ter živost znotraj hidrogela. Delo je bilo opravljeno v času 9.10. - 5.12.2007 in je predstavljeno kot sledi v naslednjih poglavjih.

4.1 MORFOLOGIJA HONDROCITOV GOJENIH V ENOSLOJNI KULTURI

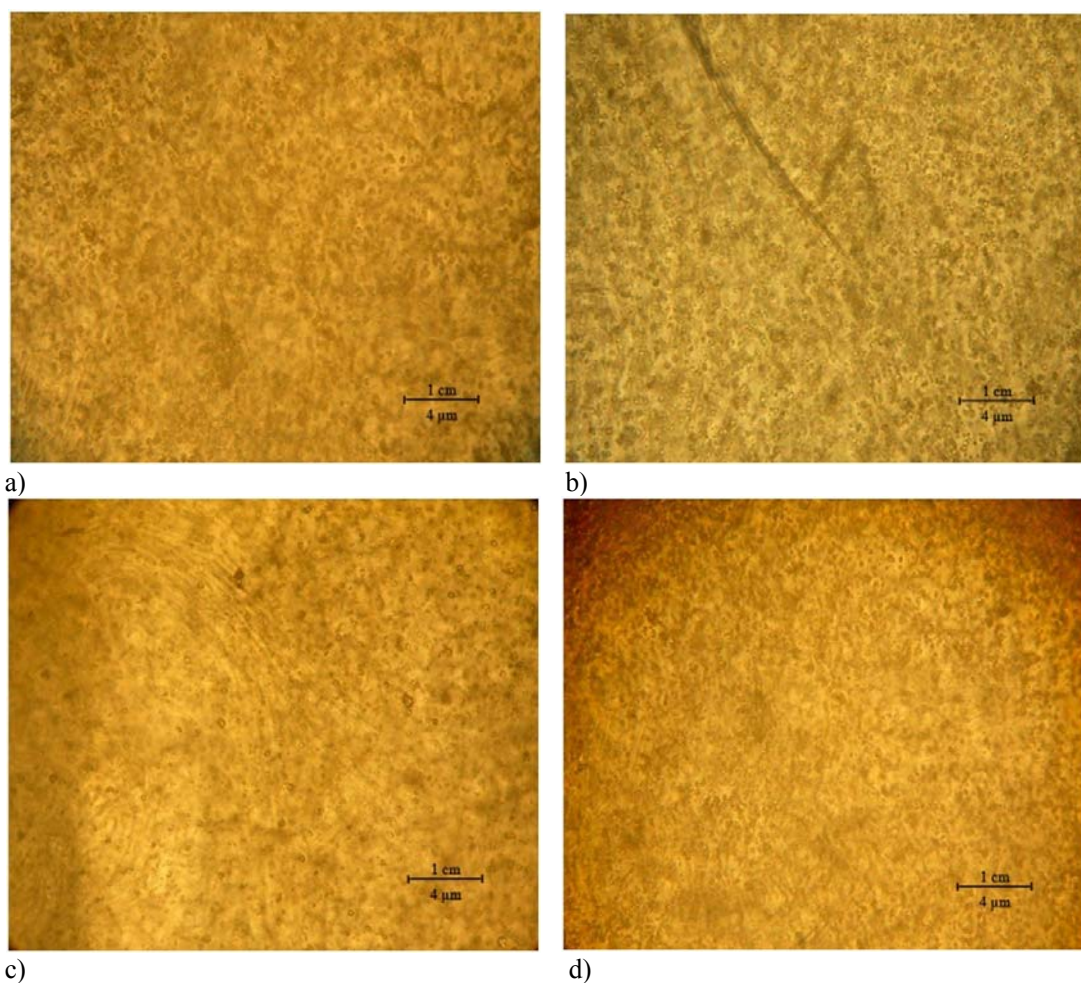
Iz zamrznjenih vzorcev primarnih kultur hondrocitov štirih bolnikov smo pripravili enoslojne kulture. Vzorci so nosili oznake NN, KL, MG, RK.



Slika 5: Fotografije primarnih kultur vzorca hondrocitov NN posnetih po določenem času gojenja in pri različnih povečavah. a) Ob dnevu nasaditve, 100-kratna povečava; b) Po prvem dnevu gojenja, 100-kratna povečava; c) Po devetih dnevih gojenja, 40-kratna povečava; d) Po devetih dnevih gojenja, 100-kratna povečava

Nasaditvena gostota celic je bila 3000 celic/cm^2 . Celice iz primarnih kultur smo gojili do 80 % konfluente. Pomnoževanje hondrocitov je bilo različno hitro. 80 % prerast dna je bila dosežena po minimalno 7-ih dnevih oz. maksimalno 9-ih dnevih. Celice so pred pritrditvijo na dno gojilne posode kazale značilno okroglo morfolologijo, po pritrditvi in začetku delitve pa so začele spreminjati obliko iz okrogle v podolgovato, fibroblastno. Pojav fibroblastne oblike celic je prvi dokaz dediferenciacije hondrocitov med gojenjem v enoslojni kulturi.

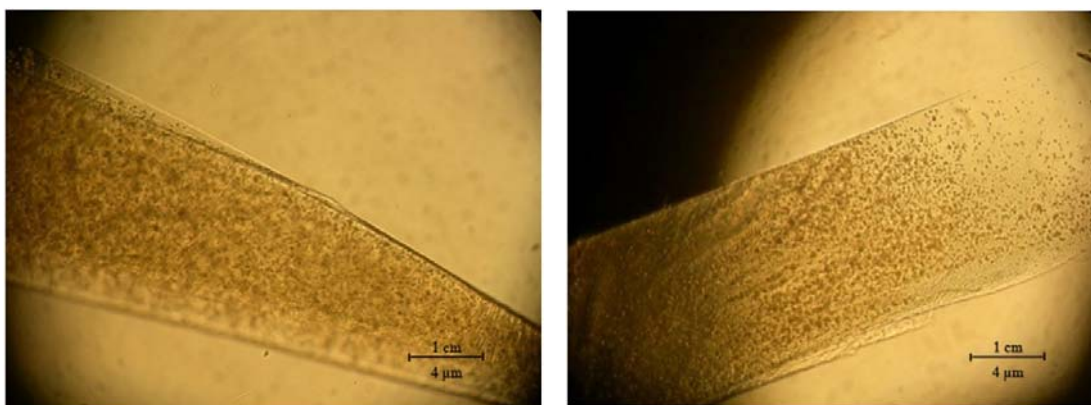
Po tripsinizaciji in nasaditvi hondrocitov v diske iz gela se je morfolologija celic spet spremenila v okroglo, kot jo imajo hondrociti v nativnem tkivu. Sprememba oblike celic iz podolgovate v okroglo je prvi dokaz rediferenciacije hondrocitov med gojenjem v tridimenzionalnem okolju.



Slika 6: Fotografije kultur hondrocitov, vzorcev NN in KL, namnoženih v enoslojni kulturi in nasajenih v hidrogel (40-kratne povečave). a) vzorec NN v hidrogelu po 14-ih dnevih gojenja v statični kulturi b) vzorec NN v hidrogelu po 14-ih dnevih gojenja v bioreaktorski kulturi; c) vzorec KL v hidrogelu po 28-ih dnevih gojenja v statični kulturi; d) vzorec KL v hidrogelu po 28-ih dnevih gojenja v bioreaktorski kulturi.

4.2 ŽIVOST CELIC ZNOTRAJ GELA PO 28-IH DNEVIH GOJENJA

Hondrocite smo po namnožitvi v prvi pasaži nasadili v diske iz mešanice alginata in agaroze (poglavje 3.2.4). Živost hondrocitov znotraj diskov smo kvalitativno določili z barvanjem in sicer z barviloma kalcein AM in etidijevim homodimerom. Žive celice so obarvane zeleno, mrtve so obarvane rdeče.

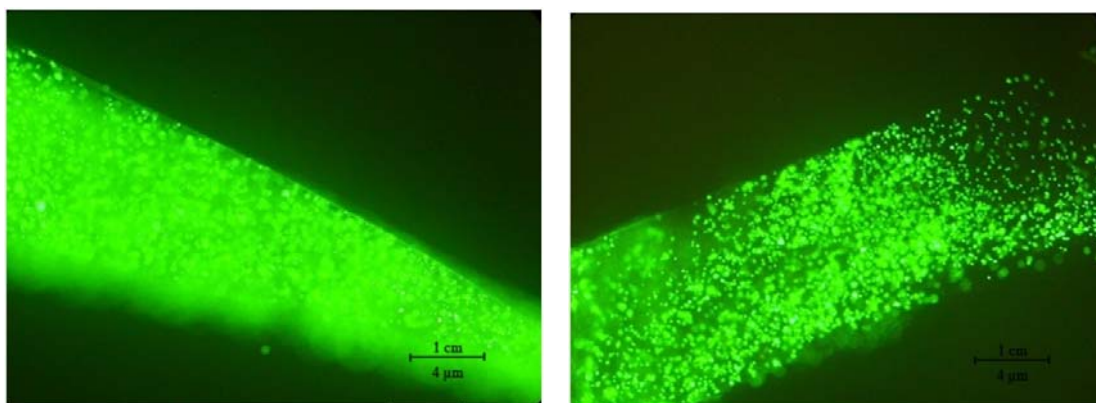


a)

b)

Slika 7: Fotografiji rezin diskov vzorca hondrocitov RK iz hidrogela pred barvanjem s fluorescenčnima barviloma. Fotografiji sta posneti pri 40-kratni povečavi.

- a) Rezina diska iz statične kulture
- b) Rezina diska iz bioreaktorske kulture

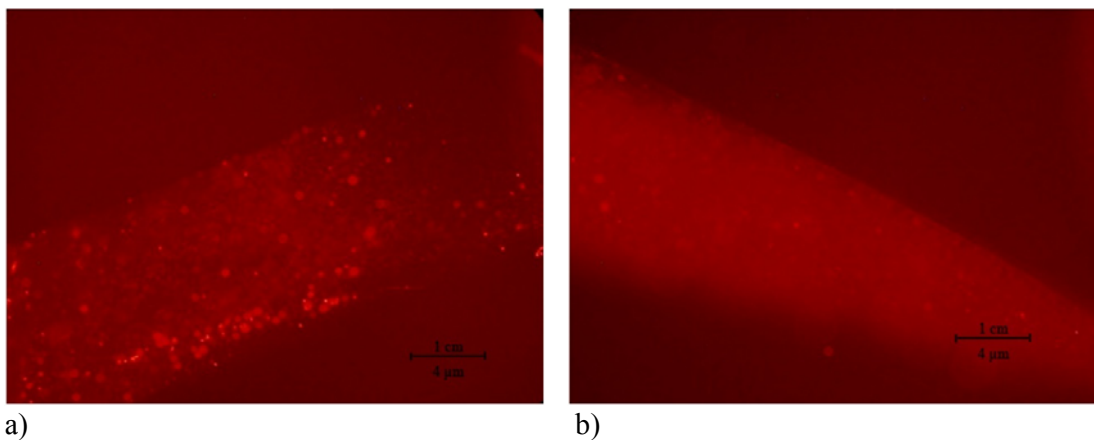


a)

b)

Slika 8: Fotografiji rezin diskov vzorca hondrocitov RK iz hidrogela po barvanju s fluorescenčnim barvilom kalcein AM. Žive celice svetijo zeleno. Fotografiji sta posneti pri 40-kratni povečavi.

- a) Rezina diska iz statične kulture
- b) Rezina diska iz bioreaktorske kulture



Slika 9: Fotografiji rezin diskov vzorca hondrocitov RK iz hidrogela po barvanju s fluorescenčnim barvilom etidijev homodimer. Mrtve celice svetijo rdeče. Fotografiji sta posneti pri 40-kratni povečavi.

- a) Rezina diska iz statične kulture
- b) Rezina diska iz bioreaktorske kulture

4.3 IZRAŽANJE GENOV SPECIFIČNIH ZA SKLEPNO HRUSTANČNO TKIVO- DEDIFERENCIACIJA IN REDIFERENCIACIJA HONDROCITOV

Hondrocite smo gojili 7, 14 in 28 dni pri temperaturi 37°C in v atmosferi s 5% CO₂. Celice prve pasaže smo gojili v posodah za gojenje monoslojnih celičnih kultur. Celice druge pasaže pa smo gojili v gelu iz agaroze in alginata in sicer v gojilnih posodah (3D statična kultura) in v bioreaktorju (3D bioreaktorska kultura). Po 7 dnevih smo opravili prvo vzorčenje. Drugo vzorčenje smo opravili po 14 dneh, zadnje vzorčenje pa po 28 dneh. Gojenje hondrocitov smo s tem zaključili.

Po opravljenem vzorčenju smo hondrocite lizirali s pomočjo lizirajočega pufra, izolirali celotno celično RNA in jo prepisali v cDNA. Stopnjo izražanja genov smo ovrednotili z metodo PCR v realnem času. Ovrednotenje izražanja genov nam je omogočilo izračun ustreznih diferenciacijskih indeksov. Diferenciacijski indeks opisuje diferenciacijsko stopnjo hondrocitov, kjer višje vrednosti pomenijo bolj hialini tip celic.

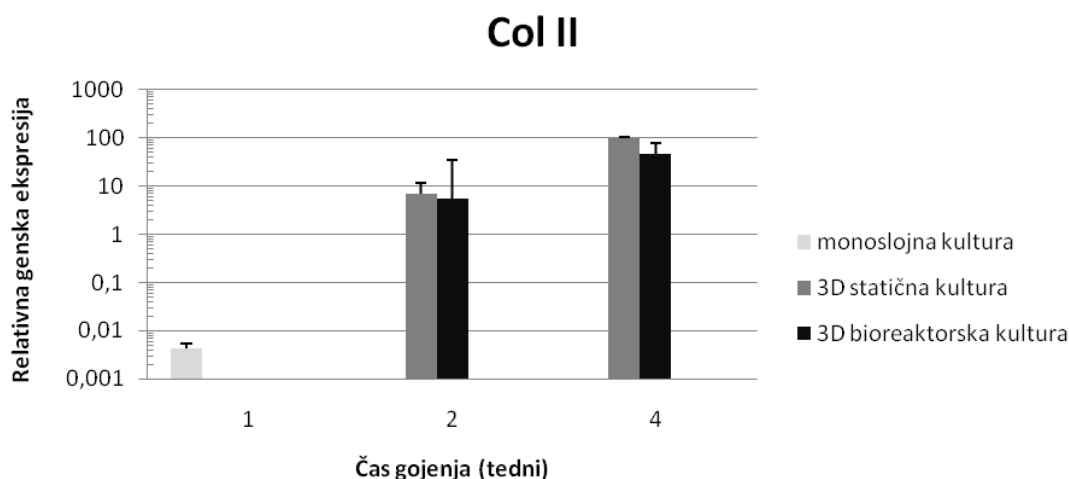
V nadaljevanju so rezultati predstavljeni v obliki preglednice in grafov. V preglednici so prikazane vse vrednosti ekspresij za posamezen gen vzorcev NN, KL, MG in RK.

Preglednica 1: Preglednica prikazuje metode gojenja in vrednosti relativne genske ekspresije za posamezen gen in vzorec. Podane so tudi vrednosti diferenciacijskih indeksov kol II/kol I in agr/ver

METODE GOJENJA	kol II norm	kol I norm	kol II/kol I	agr norm	ver norm	agr/ver
NN P1 monosloj	0,006228	2645,1232	2,355E-06	6,78484	74,00904	0,091676
NN 2P hidrogel/stat. 14 dni	4,0354574	676,18429	0,005968	19,84735	89,86025	0,220869
NN 2P hidrogel/bior. 14 dni	4,6683288	1092,5368	0,0042729	35,98411	75,62811	0,475803
NN 2P hidrogel/stat. 30 dni	121,67937	803,46685	0,1514429	74,63046	40,11106	1,860596
NN 2P hidrogel/bior. 30 dni	86,843361	1739,7517	0,0499171	75,53104	92,7541	0,814315
KL P1 monosloj	0,001547	1890,5551	8,183E-07	1,831162	52,03593	0,03519
KL 2P hidrogel/stat. 14 dni	2,8347111	357,24851	0,0079348	38,32731	57,08551	0,671402
KL 2P hidrogel/bior. 14 dni	0,5801783	582,81358	0,0009955	35,40088	93,20385	0,379822
KL 2P hidrogel/stat. 30 dni	40,488682	636,85856	0,0635756	54,20279	72,63735	0,746211
KL 2P hidrogel/bior. 30 dni	10,189573	660,42306	0,0154289	7,585223	167,8242	0,045197
MG P1 monosloj	0,0060554	1935,7987	3,128E-06	6,621976	228,2896	0,029007
MG 2P hidrogel/stat. 14 dni	19,792517	609,90963	0,0324516	54,60506	28,35529	1,925745
MG 2P hidrogel/bior. 14 dni	11,726497	885,53081	0,0132423	45,49388	45,96885	0,989668
MG 2P hidrogel/stat. 30 dni	168,92348	983,85008	0,1716964	74,35126	34,95661	2,126959
MG 2P hidrogel/bior. 30 dni	58,579666	866,39145	0,0676134	34,80436	53,74467	0,647587
RK P1 monosloj	0,0036335	2332,9322	1,557E-06	11,63042	364,8829	0,031874
RK 2P hidrogel/stat. 14 dni	1,5692603	238,27548	0,0065859	10,64025	75,76099	0,140445
RK 2P hidrogel/bior. 14 dni	4,3026774	732,17474	0,0058766	20,26841	101,2837	0,200115
RK 2P hidrogel/stat. 30 dni	60,476421	1742,2177	0,0347123	70,02995	108,4722	0,645603
RK 2P hidrogel/bior. 30 dni	33,898334	1297,3749	0,0261284	31,68805	154,2439	0,205441

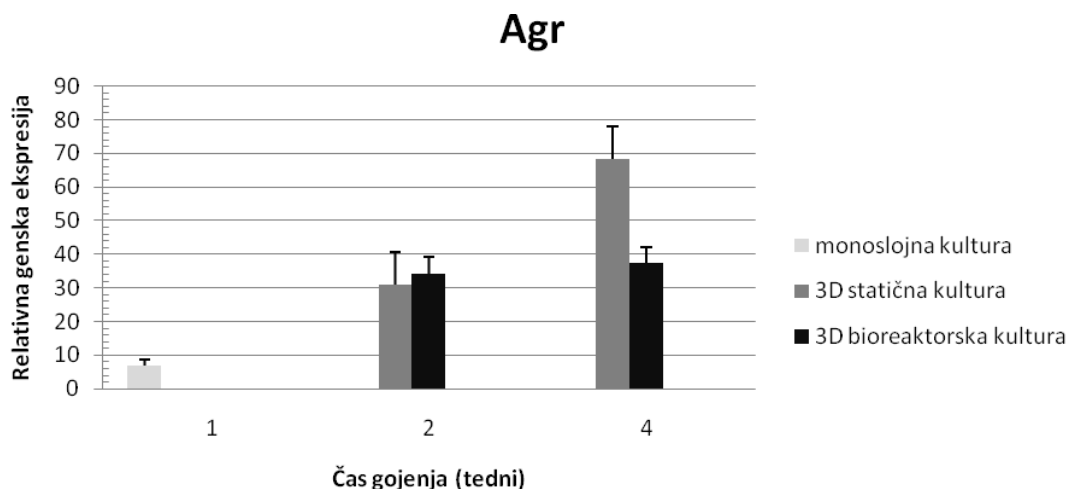
Slike prikazujejo povprečne vrednosti relativne genske ekspresije, zraven tega pa so podane tudi vrednosti diferenciacijskih indeksov za kol II/kol I in agr/ver.

Rezultati kažejo, da se je ekspresija gena za kolagen II (Slika 10) povečala od monosloja prve pasaže do druge pasaže 3D kultur, kar kaže na uspešno rediferenciacijo. Ekspresija gena za kolagen II se je potem, ko smo hondrocite nasadili v hidrogel povišala za 1641-krat. Nivo izražanja po dveh tednih je bil približno enak $\pm$ SD za obe kulturi, 3D statično in 3D bioreaktorsko kulturo. Po štirih tednih gojenja je bila stopnja ekspresije še višja. Izražanje gena za kolagen II se je glede na vrednosti po dveh tednih povišalo za 13,9-krat (3D-statična kultura) oz. 9,2-krat (3D-bioreaktorska kultura), glede na primarno kulturo monosloja pa se je izražanje povečalo za približno 20.000 krat (3D-statična kultura) oz. za približno 11.000 krat (3D-bioreaktorska kultura).



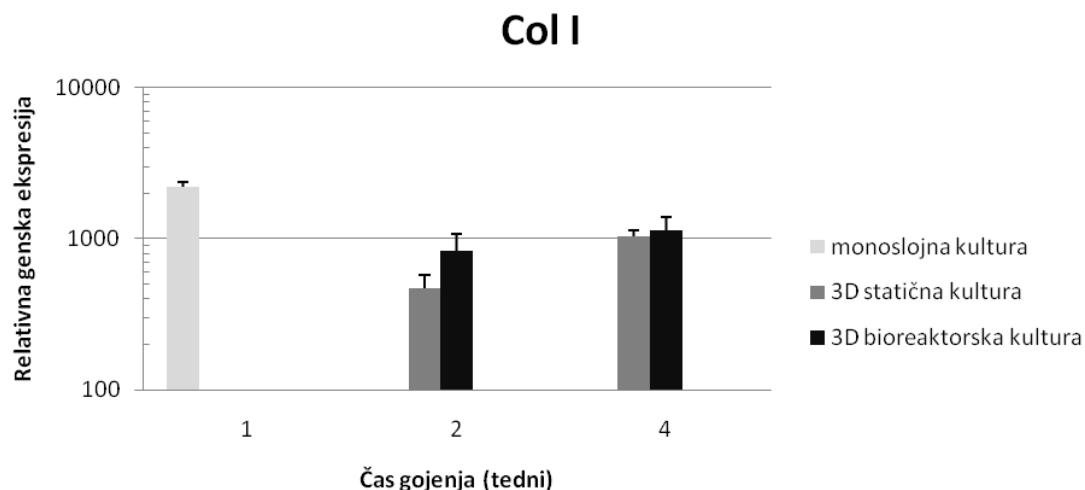
Slika 10: Vrednosti izražanja gena kolagen II tekom gojenja v monoslojni kulturi, 3D statični in 3D bioreaktorski kulturi (37°C in 5% CO₂). Prikazane so srednje vrednosti s standardno napako.

Podobno kot kolagen II se je izražal tudi agrekan (Slika 11). Izražanje je bilo nekoliko višje v statični kulturi glede na bioreaktorsko. Ekspresija se je po presaditvi celic v hidrogel povečala za faktor 4,6 (3D-statična kultura) oz. 5,1 (3D-bioreaktorska kultura). Po štirih tednih kultivacije so bile vrednosti kultivacije še nekoliko višje. Če primerjamo relativno gensko ekspresijo po dveh in štirih tednih za gen agrekan ugotovimo, da se je ta 2,2-krat povečala v primeru ko so celice bile gojene v 3D-statični kulturi, hrustančnim celicam, ki so bile gojene v bioreaktorju se je stopnja ekspresije le zanemarljivo povečala. Glede na primarno kulturo pa se je ekspresija po štirih tednih gojenja povečala za faktor 10,2 (3D-statična kultura) oz. 5,6 (3D-bioreaktorska kultura).



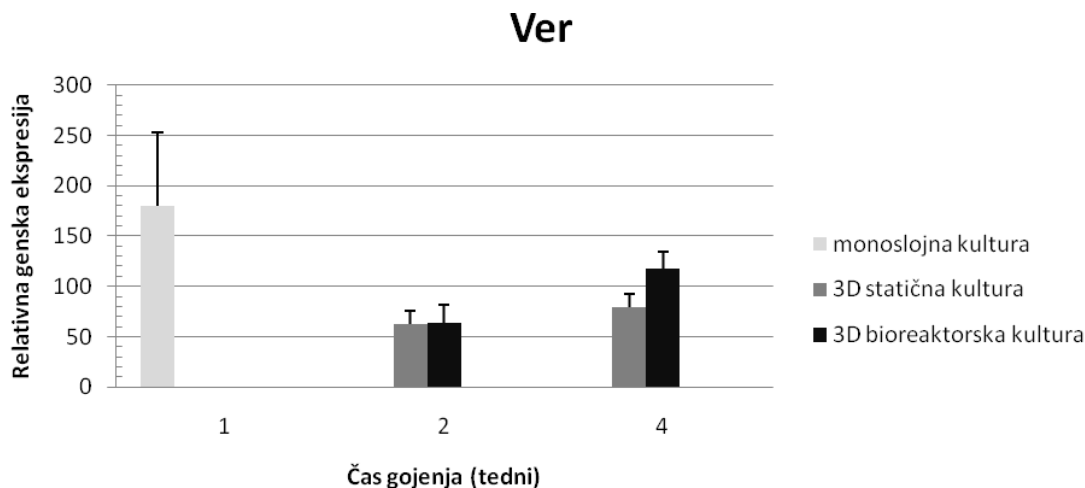
Slika 11: Vrednosti izražanja gena agrekan tekom gojenja v monoslojni kulturi, 3D statični in 3D bioreaktorski kulturi (37°C in 5% CO₂). Prikazane so srednje vrednosti s standardno napako.

Rezultati vrednotenja ekspresije gena za kolagen I (Slika 12) in verzikan (Slika 13), markerjev fibroblastnega fenotipa kažejo, da je izražanje upadlo, ko smo celice nasadili v hidrogel. Izražanje kolagena I se je ob nasaditvi v hidrogel znižalo za faktor 4,7 (3D-statična kultura) oz. 2,7 (3D-bioreaktorska kultura). Po štirih tednih gojenja se je izražanje kolagena I nekoliko zvišalo in doseglo polovico vrednosti ekspresije, ki je bila dosežena v monosloju prve pasaže. V obeh primerih je bilo izražanje gena za kolagen I višje v 3D-bioreaktorski kulturi.

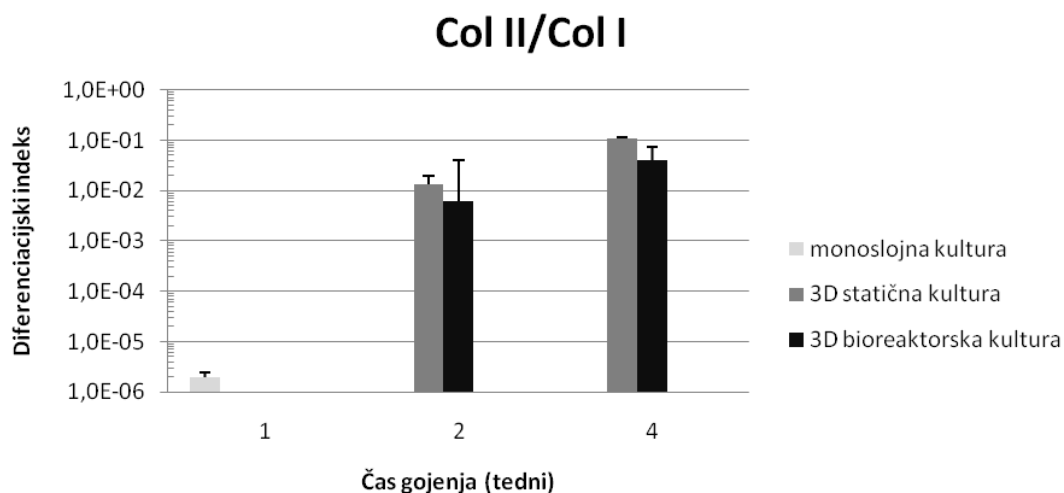


Slika 12: Vrednosti izražanja gena kolagen I tekom gojenja v monoslojni kulturi, 3D statični in 3D bioreaktorski kulturi (37°C in 5% CO₂). Prikazane so srednje vrednosti s standardno napako.

Podoben trend izražanja kot kolagen I kaže tudi verzikan (Slika 13). Izražanje je upadlo za 2,9-krat potem ko smo celice presadili iz monosloja prve pasaže v 3D-statično kulturo. Celicam, ki so bile gojene dva tedna v bioreaktorski kulturi se je izražanje znižalo za 2,3-krat. Po štirih tednih gojenja v 3D-statični kulturi ostane nivo izražanja enak, za faktor 1,5 naraste v primeru ko so celice bile gojene v bioreaktorju.

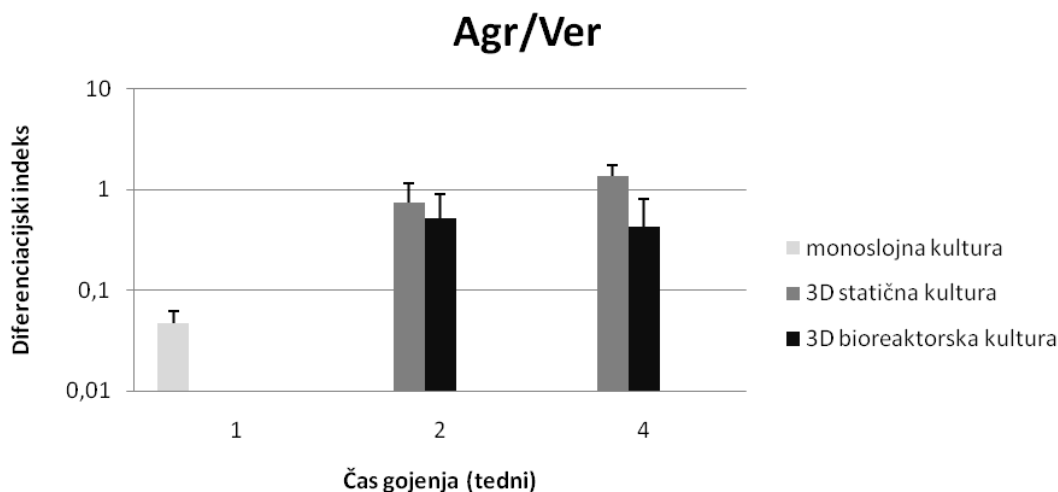


Slika 13: Vrednosti izražanja gena verzikan tekom gojenja v monoslojni kulturi, 3D statični in 3D bioreaktorski kulturi (37°C in 5% CO₂). Prikazane so srednje vrednosti s standardno napako.



Slika 14: Povprečne vrednosti diferenciacijskih indeksov kol II/kol I pri vzorcih monoslojnih kultur, 3D statične ter 3D bioreaktorske kulture. Prikazane so srednje vrednosti s standardno napako.

Če primerjamo statično in bioreaktorsko kulturo za kolagen II in diferenciacijski indeks kol II/kol I (Slika 14) ugotovimo, da je ekspresija gena približno dvakrat višja v primeru, ko so celice gojene v statični kulturi. Enak pojav smo opazili tudi pri vzorcih, ki so bili odvzeti po štirih tednih kultivacije.



Slika 15: Povprečne vrednosti diferenciacijskih indeksov agr / ver pri vzorcih monoslojnih kultur, 3D statične ter 3D bioreaktorske kulture. Prikazane so srednje vrednosti s standardno napako.

Enak trend kot diferenciacijski indeks kol II/kol I kaže tudi indeks agr/ver (Slika 15). Najvišji vrednosti sta bili doseženi v 3D statični kulturi, nekoliko nižji vrednosti pa v bioreaktorski kulturi. Opaziti je mogoče da je vrednost za 3D statično kulturo v času med obema vzorčenjema narasla, med tem ko je vrednost za bioreaktorsko kulturo v enakem času upadla.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Skladno s cilji ki so predvidevali ugotoviti vpliv načina gojenja na diferenciacijo hrustančnih celic smo se v ta namen poslužili kvantitativne metode RT-qPCR s katero smo ugotavljali stopnjo izražanja genov za izbrane komponente izvenceličnega matriksa.

5.1 FENOTIPSKE LASTNOSTI HONDROCITOV, GOJENIH V ENOSLOJNI, TRIDIMENZIONALNI IN BIOREAKTORSKI KULTURI

Hondrocyte smo gojili v treh različnih kulturah in sicer v enoslojni kulturi, tridimenzionalni in bioreaktorski kulturi. Vzorčenje enoslojne kulture smo opravili po enem tednu gojenja, vzorčenje tridimenzionalne in bioreaktorske kulture pa po dveh oz. štirih tednih. Na fenotipske lastnosti hondrocitov smo sklepali na osnovi morfologije celic med rastjo v vseh treh kulturah ter rezultatov izražanja genov, specifičnih za hialini sklepni (kolagen II in agrekan) oz. fibrozni (kolagen I in verzikan) tip hrustančnega tkiva. Izražanje genov smo določili s pomočjo metode verižnega pomnoževanja v realnem času (qPCR). Kljub temu da izražanje genov ni neposreden pokazatelj količine nastalih proteinov, kaže spremembe, ki se dogajajo na nivoju mRNA. Spremembe v fenotipu hondrocitov kažejo na proces dediferenciacije oz. rediferenciacije do katerih prihaja tekom gojenja hondrocitov.

Rutinsko se že uporablja metoda avtologne implantacije hondrocitov za zdravljenje omejenih hrustančnih lezij v kolenu (Brittberg in sod., 1994). Od leta 1996 se ta metoda uporablja tudi v Sloveniji (Drobnič in sod., 2001). Za potrebe kirurških posegov gojimo hondrocyte predvsem v enoslojnih kulturah, za potrebe raziskav pa se, poleg enoslojnih kultur uporabljajo tudi tridimenzionalne, bioreaktorske, peletne ter brezserumske kulture (Lin in sod., 2006). Enoslojne kulture hondrocitov dohranjujemo z gojilnim medijem, ki vsebuje humani serum in omogoča hitro delitev celic. Ta pojav s pridom izrabljamo zato, da celice namnožimo do željenega števila. Hrustančne celice se tekom gojenja v monoslojni kulturi pritrdijo na dno gojilne posode in izgubijo specifično morfologijo. Sprva okrogle hrustančne celice se po pritrdjevanju in razmnoževanju spremenijo v podolgovate, fibroblastom podobne celice. Ta spremenjena morfologija je posledica spremembe fenotipa, pravimo, da se hondrociti dediferencirajo (Marlovits in sod., 2004).

Uspešnost zdravljenja hrustančnega tkiva je odvisna od kvalitete celic (t.j. njihovega fenotipa), ki jih vnesemo v poškodovano mesto. Ključnega pomena je zato živost celic in sposobnost izražanja specifičnih genov. Želimo, da so tkivno-inženirski pripravki hondrocitov čim bolj podobni hialinemu sklepnemu hrustančnemu tkivu. Glavna ovira pri doseganju tega cilja je dediferenciacija celic. Z uspešnim procesom rediferenciacije lahko celicam povrnemo nekaj lastnosti, ki so jih imele pred razmnoževanjem v *in vitro* pogojih.

V raziskavi nas je zanimalo kakšen vpliv imajo okoliščine gojenja na izražanje genov, specifičnih za hialino sklepno hrustančno tkivo (kolagen II (kol II) in agrekan (agr), ter genov, specifičnih za dediferencirane hondrocyte (kolagen I (kol I) in verzikan (ver)). Kol II in agr sta specifična markerja za aktivnost hondrocitov, ki imata pomembno vlogo pri opredelitvi mehaničnih lastnosti sklepnega hrustanca. Zaradi tega želimo, da je izražanje oz. sinteza teh dveh beljakovin čim večja. Da ima hidrogel pomembno vlogo pri procesu rediferenciacije smo vedeli in smo s to nalogo še enkrat dokazali. Ugotoviti pa smo želeli ali lahko uporaba bioreaktorja še kako izboljša proces rediferenciacije in doprinese k

boljšim rezultatom. Bioreaktor, ki smo ga uporabili ima to prednost, da nudi hrustančnim celicam mikrogravitacijsko okolje, omogoča medcelične interakcije, zniža možnost poškodbe celic ter vzpostavlja okolje z nizkimi strižnimi silami (Marlovits in sod., 2003; Darling in sod., 2003).

Izražanje gena, ki kodira poglavitno sestavino izvenceličnega matriksa hialinega tipa hrustančnega tkiva, kolagena II, je bilo med gojenjem v enoslojnih kulturah zelo nizko. Po presaditvi celic v drugo pasajo in sicer v diske iz hidrogela in bioreaktor se je izražanje gena po dveh tednih povečalo. Povečanje smo pričakovali, nismo pa pričakovali, da bo izražanje gena višje v statični 3D kulturi v primerjavi z bioreaktorsko kulturo. Zelo podobni rezultati so sledili tudi po zadnjem vzorčenju (Slika 10). Mnogi avtorji namreč navajajo, da uporaba rotacijskega bioreaktorja pripomore k povrnitvi fenotipa, ki je značilen za hondrocite. (Darling in sod., 2005; Marlovits in sod., 2003; Bilodeau in Mantovani, 2006; Tallheden in sod 2004).

Druga specifična komponenta izvenceličnega matriksa hondrocitov sklepnega hrustanca je proteoglikan agrekan. Nivo izražanja gena, ki kodira njegovo sintezo, je bil v enoslojni kulturi pričakovano nizek. Nivo se je povečal s presaditvijo celic v tridimenzionalno okolje, v diske iz hidrogela. Rezultati izražanja gena za agrekan kažejo, da gojenje hrustančnih celic v biorektorski kulturi ni nič bolj uspešno kot gojenje v 3D statični kulturi (Slika 11). Po dveh tednih je bilo izražanje gena za agrekan približno enako v obeh kulturah, po štirih tednih pa se je izražanje v 3D statični kulturi povečalo in doseglo dvojno vrednost ekspresije gena v bioreaktorski kulturi.

V nalogi smo uporabili 10 mililitrski rotacijski bioreaktor, v katerem smo gojili celice nasajene v nosilec iz alginat-agaroznega hidrogela. Zelo verjetno je, da hondrociti za optimalno izražanje specifičnih genov zahtevajo mehanske dražljaje, ki so prisotni v naravnem okolju hondrocitov. Številni avtorji namreč navajajo zunanje obremenitve kot učinkovit dejavnik povrnitve specifičnega hrustančnega fenotipa (Darling in Athanasiou, 2003). Na osnovi rezultatov, ki smo jih dobili v naši nalogi, težko upravičimo uporabo bioreaktorja. Gojenje v 3D-statična kulturi daje najboljše rezultate.

Glede na to, da smo hrustančne celice v 3D statični kulturi in bioreaktorju dohranjevali z enakim gojilnim medijem in da so celice bile nasajene v enako velikih diskah iz hidrogela je razlog za slabše rezultate bioreaktorske kulture mogoče iskati v neprimernih obremenitvah, ki so jim bile celice tekom gojenja izpostavljene. V našem primeru težko določimo, ali so celice bile izpostavljene prevelikim ali premajhnim obremenitvam, lahko pa trdimo, da so bile izpostavljene neprimernim obremenitvam. Do podobnih rezultatov so prišli tudi drugi avtorji, ki so uporabili agarozni hidrogel v kombinaciji z bioreaktorjem saj navajajo, da je znotraj nosilca potrebna določena kritična gostota celic in šele, ko je ta pogoj izpolnjen lahko pride do pozitivnega učinka bioreaktorja (Hu in Athanasiou, 2004). Kritična gostota je zelo verjetno povezana s takšno gostoto celic, ki omogoča v nosilcu primerne interakcije med samimi celicami, kot tudi med celicami in zunajceličnim matriksom, ki ga proizvajajo (Hu in Athanasiou, 2004).

Tkivno inženirski pripravki, ki smo jih uporabili v naši študiji so vsebovali 10×10^6 celic/ml. Takšna gostota je zelo blizu gostoti hrustančnih celic, ki se nahajajo v naravnem

sklepnem hrustancu. V literaturi navajajo različne rezultate določanja optimalne koncentracije hondrocitov v tridimenzionalnih pripravkih. Ponekod je opisana visoka stopnja izražanja gena za kol II in agr pri nižjih koncentracijah, okrog 10^4 celic/ml (Lee in sod., 2003), v drugi študiji pa najdemo podatek o izboljšanju fenotipa celic pri 5×10^6 celic/ml (Heywood in sod., 2004).

Z metodo za kvalitativno določanje živosti hondrocitov v diskih iz gela smo lahko ugotovili, da je odstotek živih celic v diskih zelo visok. V obeh sistemih debelina diskov očitno ni predstavljala ovire za prosto difuzijo hranil in kisika do hondrocitov v osrednjem delu diskov. Prisotnost manjšega števila mrtvih celic je normalen pojav pri vsakem postopku, ki vključuje presajanje izredno občutljivih evkariontskih celic iz enega okolja v drugo.

S to nalogo smo ugotovili, da je hidrogel iz alginata in agaroze primeren nosilec za pripravo konstruktov v tkivnem inženirstvu hrustančnega tkiva. Omogoča rediferenciacijo predhodno dediferenciranih hondrocitov in zato predstavlja dobro rešitev v razvoju metode avtologne implantacije hondrocitov. Celice si v gelu relativno hitro povrnejo specifičen fenotip in zato potrebujejo po implantaciji na mestu poškodbe manj časa za popolno rediferenciacijo. Dodatno prednost predstavlja tudi poltrdo agregatno stanje gela, s katerim v primerjavi s suspenzijsko kulturo lažje rokujemo.

V prihodnosti bo potrebno natančneje preučiti vpliv zunanjih dejavnikov in mehanskih obremenitev na rast hondrocitov. Še naprej bo potrebno razvijati bioreaktorsko tehniko in ugotoviti kateri nosilci so najbolj primerni za uporabo v povezavi z bioreaktorjem. Morda bo v prihodnosti bolj verjetna uporaba perfuzijskih bioreaktorjev, takšnih ki omogočajo boljši pretok hranil skozi nosilec in natančnejšo regulacijo bioprocasa. Poleg perfuzijskih bioreaktorjev pa se zdijo obetavni tudi takoimenovani kompresijski aparati, ki morda najboljše posnemajo okolje v katerem živijo hrustančne celice (Darling in Athanasiou, 2003). Zelo verjetno bo potrebno standardizirati tudi čas gojenja v posamezni fazi namnoževanja in upoštevati biološko spremenljivost, ki obstaja na nivoju posameznika.

5.2 SKLEPI

- S pomočjo kvalitativnega določanja živosti celic v diskih iz hidrogela smo tako v 3D statični kot bioreaktorski kulturi dokazali visok odstotek preživetja celic po 14 oz. 28 dnevih gojenja
- Z opazovanjem hondrocitov med gojenjem v 3D statični in bioreaktorski kulturi smo dokazali spremembo morfologije iz dediferencirane v rediferencirano obliko.
- Z analizo izražanja genov specifičnih za hialini in vezivni tip hrustančnega tkiva smo dokazali rediferenciacijo hondrocitov v tridimenzionalnih kulturah po 14 in 28 dneh gojenja
- Nismo dokazali pozitivnega učinka uporabe bioreaktorja z nosilcem na proces rediferenciacije
- V prihodnosti bo potrebna natančnejša definicija vplivov posameznih dejavnikov okolja (razlik med posamezniki, vpliv sestave gojišča, koncentracija celic v nosilcih, učinek mehanskih obremenitev) potreben pa bo tudi razvoj na področju izdelave bioreaktorjev.

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti vpliv rotacijskega bioreaktorja na gojenje hondrocitov v tridimenzionalnem nosilcu iz mešanice alginata in agaroze. Poskus smo opravili na vzorcih sklepnega hrustančnega tkiva štirih bolnikov. Izolirane hondrocite smo gojili v enoslojni kulturi do prve pasaže. Ko je bila dosežena 80% konfluenca, smo enoslojno kulturo celic tripsinizirali ter celice nasadili v enoslojno kulturo druge pasaže in v diske iz mešanice alginata in agaroze. Celice v diskah smo nato gojili v statični oz. bioreaktorski kulturi. Hondrocite v monosloju druge pasaže smo gojili en teden, celice v 3D-statični in bioreaktorski kulturi pa 14 oz. 28 dni. Hondrocite smo dohranjevali z gojilnim medijem, ki je vseboval 15% humanega seruma. Po zaključeni inkubaciji smo ugotavljali živost celic znotraj nosilca. Uporabili smo fluorescenčni barvili, kalcein AM in etidijev homodimer. S pomočjo fluorescenčnega mikroskopa smo kvalitativno določili živost celic. Po gojenju hondrocitov smo analizirali tudi izražanje genov, specifičnih za hialini sklepni hrustanec (kol II, agr) ter vezivni hrustanec (kol I, ver). Iz celic smo izolirali celotno RNA, jo prepisali v cDNA in analizirali izražanje gena z metodo verižnega pomnoževanja v realnem času (real-time-PCR). Morfologija hondrocitov se je med gojenjem v enoslojnih kulturah spremenila iz okrogle v podolgovato, fibroblastno, kar kaže na proces dediferenciacije. Po nasaditvi dediferenciranih celic v tridimenzionalno okolje, pripravljeno iz gela, je prišlo do spremembe nazaj v okroglo morfologijo, kar kaže na proces rediferenciacije hondrocitov. Živost celic v diskah iz gela je bila visoka ne glede na kulturo v kateri so celice rastle. To kaže, da je gel iz alginata in agaroze primerno okolje za rast in rediferenciacijo hondrocitov. Dediferenciacijo in rediferenciacijo hondrocitov smo dokazali tudi z ugotavljanjem razlik v nivojih izražanja specifičnih genov. Izražanje posameznih genov smo predstavili v obliki relativne genske ekspresije in v obliki diferenciacijskih indeksov kol II/kol I in agr/ver. Oba indeksa prikazujeta podobne spremembe med poskusom, nizka vrednost med gojenjem v enoslojni kulturi in dvigovanje vrednosti do 28 dneva gojenja, tako v 3D-statični kot bioreaktorski kulturi. Pozitivnega učinka uporabe bioreaktorja nam ni uspelo dokazati. Vse vrednosti genske ekspresije za hialini sklepni hrustanec (kol II, agr) so namreč višje v 3D statični kulturi kot v bioreaktorski. Razlog za dobljene rezultate je zelo verjetno v nepoznavanju učinka obremenitev na celice, nepoznavanje kritične gostote celic v nosilcu ter nenazadnje medsebojni vpliv teh dveh dejavnikov. Zaradi velikega števila zunanjih dejavnikov, ki jih ne poznamo dovolj natančno, bo v prihodnosti potrebno natančneje preučiti vpliv mehanskih obremenitev na rast hondrocitov, potrebno bo standardizirati postopke odvzema biopsije, sestavo gojilnega medija in čas gojenja v posamezni fazi namnoževanja. Še naprej bo potrebno razvijati bioreaktorsko tehniko in ugotoviti kateri nosilci so najbolj primerni za uporabo v povezavi z bioreaktorjem. V nalogi smo dokazali ustreznost gela iz mešanice alginata in agaroze v pripravi konstruktov iz hondrocitov. Hrustančne celice v gelu ohranijo specifični hondrocitni fenotip - morfologijo celic, pospešeno izražanje specifičnih genov in znižan nivo izražanja nespecifičnih genov.

7 VIRI

Baksh D. Song L., Tuan R. S. 2004. Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8, 3: 301-312

Berovič M. 1996. Bioreaktorji za aerobne bioprocese. V: *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 437-457

Bilodeau K., Mantovani D. 2006. Bioreactors for tissue engineering: Focus on mechanical constraints. A comparative review. *Tissue Engineering*, 12, 8: 2367-2380

Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O., Peterson L. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New England Journal of Medicine*, 331, 14: 889-895

Brown T.A. 2002. *Genomes*. 2nd ed. Oxford, BIOS Scientific: 550 str.

Chaplin M. 2008. Water structure and science. London, Martin Chaplin (november 2008) <http://www1.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html> (november 2008): 1 str.

Darling E. M., Athanasiou K. A. 2005. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *Journal of Orthopaedic Research*, 23: 425-432

Darling E. M., Athanasiou K. A. 2003. Articular cartilage: Bioreactors and bioprocesses. *Tissue Engineering*, 9, 1: 9-23

Darling E. M., Athanasiou K. A. 2005. Retaining zonal chondrocyte phenotype by means of novel growth environments. *Tissue Engineering*, 11, 3/4: 395-403

DeLee J. C., Drez D., Miller M.D. 2003. *Orthopaedic sports medicine*. 2nd ed. Philadelphia, Elsevier Science: 67-73

Drobnic M., Radosavljevic D., Koritnik B., Gorens ek, M., Kregar-Velikonja N., Jeras M., Knežević M. 2001. Five years of autologous chondrocyte transplantation (ACT) for the knee cartilage lesions. V: *Cartilage Weekend. The 2nd symposium of recent advances in cartilage repair and tissue engineering*. Ljubljana, Orthopaedic Clinic, Clinical Centre: 48-48

Farrell E. R. 1998. *RNA methodologies*. 2nd ed. New York, Academic Press: 37-53

Freed L.E., Langer R., Martin I., Pellis N. R., Vunjak-Novaković G. 1997. Tissue engineering of cartilage in space. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 25: 13885-13889

Frederick M. A., Roger B., Robert E. K., David D. M. 1999. *Current protocols in molecular biology*. 4th ed. New York, John Wiley & Sons: 4-10

- Frenkel S. R., Di Cesare P. E. 2004. Scaffolds for articular cartilage repair. *Annals of Biomedical Engineering* 32, 1: 26-34
- Freshney R. I. 2005. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 5th ed. New York, Wiley-Liss Inc: 642 str.
- Heywood H., Sembi P. K., Lee D., Bader D. 2004. Cellular utilization determines viability and matrix distribution profiles in chondrocyte-seeded alginate constructs. *Tissue Engineering*, 10, 9/10: 1467-1479
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis:real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 9: 1026-1030
- Hu J. C., Athanasiou K. A. 2005. Low-density cultures of bovine chondrocytes: Effects of scaffold material and culture system. *Biomaterials*, 26: 2001-2012
- Kregar Velikonja N. 2002. Diferenciacija in tkivno specifično izražanje genov v kulturi humanega hialinega hrustanca. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 1-24
- KU Medical Center. 1996. Hyaline. Kansas, University of Kansas Medical Center
<http://www.kumc.edu/instruction/medicine/anatomy/histoweb/cart/cart.htm> (november 2008): 1 str.
- Lee D.A., Reisler T., Bader D. 2003. Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocytic phenotype compared to conventional monolayer techniques. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 74, 1: 6-15
- Lin Z., Willers C., Xu J., Zheng M.-H. 2006. The chondrocyte: Biology and clinical application. *Tissue Engineering*, 12, 7: 1971-1984
- Marlovits S., Tichy B., Truppe M, Gruber D., Vecsei V. 2003. Chondrogenesis of aged human articular cartilage in a scaffold-free bioreactor. *Tissue Engineering*, 9, 6: 1215-1224
- Marlovits S., Hombauer M., Truppe M., Vecsei V., Schlegel W. 2003. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 86: 286- 295
- Mendelson K., Schoen F. J. 2006. Heart valve tissue engineering: Concepts, approaches, progress and challenges. *Annals of Biomedical Engineering*, 34, 12: 1799-1819
- Merchuk J.C., Asenjo J.A. 1994 Fundamentals of bioreactor design . V: Bioreactor system design. Asenjo J.A., Merchuk J.C. (eds.). New York, Marcel Dekker : 139-257

- Mizuno S., Allemann F., Glowacki J., 2001. Effects of medium perfusion on matrix production by bovine chondrocytes in three-dimensional collagen sponges. *Journal of Biomedical Materials Research*, 56: 368-375
- Moos V., Sieper J., Herzog V., Muller B.M. 2001. Regulation of expression of cytokines and growth factors in osteoarthritic cartilage explants. *Clinical Rheumatology*, 20, 5: 353-358
- Nolan T., Hands R. E., Bustin S. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1, 3: 1559-1582.
- Papadopoulos N. G., Dedoussis G. V., Spanakos G., Gritzapis A. D., Baxeavanis C. N., Papamichail M. 1994. An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 28,177: 101-111
- Pazzano D., Mercier K.A., Moran J.M., Fong S.S., Di Biasio D.D., Rlf J. X., Kohles S.S., Bonassar L.J. 2000. Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture. *Biotechnology Progress*, 16, 5: 893-896
- Petrovič D., Zorc M. 2005. Histologija. Ljubljana, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani: 17-33
- Radosavljevič D., Drobnič M., Gorenšek M., oritnik B., Kregar Velikonja N., Maličev E., Jeras M., Knežević M. 2003. Operativno zdravljenje okvar sklepnega hrustanca v kolenu. *Medicinski Razgledi*, 42: 47-57
- Ross H. M., Pawlina W. 2006. Histology: A text and atlas with correlated cell and molecular biology. 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins: 182-192
- Sambrook J., Russell W. D. 2001. Molecular cloning. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 7.3-7.5
- Schulze-Tanzil G., De Souza P., Villegas Castrejon H., John T., Merker H., Scheid A. Shakibaei M. 2002.Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell and Tissue Research*, 3, 308: 371-379
- Strehl R., Schumacher K., de Vries U., Minuth W. W. 2002. Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering. *Tissue Engineering*, 8, 1: 37-42
- Synthecon. 2000. RCCS-4D. Houston, Incorporated
<http://www.synthecon.com/> (maj 2008): 1 str.

Tallheden T., Karlsson C., Brunner A., van der Lee J., Hagg R., Tommasini R., Lindahl A. 2004. Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12: 525-535

Vacanti J. P., Langer, R. 1999. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Molecular Medicine*, 354: 32-34

Vacanti C. A. 2006. The history of tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10, 3: 569-576

Velikonja N. K., Coer A., Gorenek M., Knezević M., Kmetec A. 2008. Tissue formation following implantation of cultured elastic chondrocytes for treatment of vesicoureteral reflux. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23, 2:764-766

Vunjak-Novakovic G., Freed L.E., Biron R.J., Langer. R. 1996. Effects of mixing on tissue engineered cartilage. *Journal of the American Institute of Chemical Engineers*, 42, 3: 850-860

Zhang Z., McCaffery J. M., Spencer R. G., Francomano C. A. 2004. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *Journal of Anatomy*, 205, 3: 229-237

Yannas I. V. 2004. Biologically active scaffolds based on collagen-GAG copolymers. V: *Scaffolding in tissue engineering*. Ma P. X., Elisseeff J. H. (eds.). New York, Taylor and Francis: 3-18