

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Petra HVALA

**PRIMERJAVA FENOTIPSKIH LASTNOSTI MEZENHIMSKIH
MATIČNIH CELIC IN GLIOBLASTOMSKIH CELIČNIH LINIJ V
INDIREKTNI KO-KULTURI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF
MESENCHYMAL STEM CELLS AND GLIOBLASTOMA CELL
LINES IN INDIRECT CO-CULTURE**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2011

Z diplomskim delom končujem Univerzitetni študij kmetijstvo – zootehnika na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del je bil opravljen v laboratorijih Nacionalnega inštituta za biologijo.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Tanjo Kunej in za somentorico asist. dr. Heleno Motaln.

Recenzent: prof. dr. Peter DOVČ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan ŠTUHEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Članica: asist. dr. Helena MOTALN
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka

Član: prof. dr. Peter DOVČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Petra HVALA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 616(043.2)=163.6
KG	medicina/možganski tumor/multiformni glioblastom/mezenhimske matične celice/glioblastomske celice/fenotipske lastnosti
KK	AGRIS /
AV	HVALA, Petra
SA	KUNEJ, Tanja (mentorica)/MOTALN, Helena (somentorica)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2011
IN	PRIMERJAVA FENOTIPSKIH LASTNOSTI MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IN GLIOBLASTOMSKIH CELIČNIH LINIJ V INDIREKTNI KO-KULTURI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 81 str., 10 pregl., 30 sl., 148 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Multiformni glioblastom (angl. <i>Glioblastoma multiforme</i> ; GBM) je najbolj agresiven možganski tumor, ki ga je z operacijo in obsevanji težko odstraniti, saj posamezne celice infiltrirajo v okoliško zdravo možganovino. Cilj zdravljenja je zato učinkovito uničiti glavno tumorsko maso skupaj z infiltriranimi rakastimi celicami v okoliški možganovini. Druga lastnost GBM je njegova heterogenost. Sestavlja ga več različnih celičnih tipov, ki se med seboj razlikujejo po morfologiji, hitrosti rasti, stopnji malignosti in invazivnosti. Pri zdravljenju raka danes največ obetajo mezenhimske matične celice (MMC), saj po implantaciji dokazano migrirajo k tumorju in v samo tumorsko maso. Zaradi te in drugih lastnosti bi lahko genetsko spremenjene MMC uporabili kot transportno sredstvo za vnos protirakave učinkovine do tumorskih celic. Namen diplomske naloge je bil ovrednotiti medsebojni vpliv MMC (MMC1 in MMC2) in celičnih linij GBM (U373, U251 in U87) v ko-kulturah ter z uporabo kondicioniranih gojišč (CM). Analizirali smo rastni odziv celic, prisotnost mikrojeder (MJ) v celicah ter pojav apoptoze. Preverjali smo stopnjo proliferacije vseh petih celičnih linij pri različni količini serum (FBS) v gojišču. Proliferacija MMC se je stopnjevala sorazmerno s povečevanjem količine serum v gojišču. Rast MMC je bila največja v gojišču z 20 % serum, kar kaže na njihovo specifično zahtevnost. Celične linije GBM pa so stopnjevale rast do 10 % FBS v gojišču, med tem, ko je 20 % serum nanje deloval zaviralno. To kaže na prilagodljivost metabolizma celic GBM, ki so sposobne rasti tudi v manj optimalnih pogojih, kot je sredica tumorja, kjer vlada hipoksija in pomanjkanje hrani. Dokazali smo, da celice GBM stimulirajo rast MMC, medtem ko MMC zavirajo rast GBM. Inhibicijo rasti smo opazili tudi v ko-kulturah različnih linij GBM. CM celic GBM zmanjšuje pojav MJ in apoptotičnih celic pri MMC, enako tudi CM MMC deluje na celice GBM. Nasprotno pa CM celic U87 poveča število MJ v celicah U373 in U251 kar kaže na obstoj hierarhije tudi med linijami GBM.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 616(043.2)=163.6
CX medicine/brain tumor/glioblastoma multiforme/mesenchymal stem cells/glioblastoma cells/phenotypic characteristics
CC AGRIS /
AU HVALA, Petra
AA KUNEJ, Tanja (supervisor)/MOTALN, Helena (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2011
TI COMPARISON OF PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF MESENCHYMAL STEM CELLS AND GLIOBLASTOMA CELL LINES IN INDIRECT CO-CULTURE
DT Graduation Thesis (University Studies)
NO XIV, 81 p., 10 tab., 30 fig., 148 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive brain tumor, hard to remove by surgery and radiation due to a single cell invasion into healthy surrounding brain tissue. The aim of developing therapies is therefore effective destruction of the tumor mass together with the elimination of all infiltrated cancer cells. Another feature of GBM is its heterogeneity. GBM consists of different cell types which differ in morphology, growth rate, degree of malignancy and invasiveness. In the treatment of cancer, mesenchymal stem cells (MSC) seem to be the most promising, due to their proven ability to migrate and infiltrate the tumor. Considering all these features, genetically modified MSC could be used as a transport vehicle for anti-cancer drug delivery to tumor cells. The purpose of this study was to evaluate the interaction of MSC (MSC1 and MSC2) and GBM cell lines (U373, U251 and U87) in co-cultures and the impact of conditioned media (CM). Cell growth response, the presence of micronucleus (MN) in the cells and the occurrence of apoptosis were analyzed. Proliferation response of all five cell lines to different amounts of serum (FBS) in medium was also evaluated. We found higher MSC proliferation in proportion to the increasing quantities of serum in the medium. MSC cells were growing best in 20 % serum, displaying their high nutrient demand. Meanwhile, GBM cell lines increased their growth in 10 % serum, whereas 20 % serum inhibited their growth. This demonstrates the flexibility of GBM's metabolism, which *in vivo* is necessary for cells to survive in hypoxic and nutrient deprived regions of the tumor. Further, we proved that GBM cells stimulate MSC cell growth while MSC cells inhibit the growth of GBM cells just as well as GBM cell lines inhibit growth among themselves. CM of GBM cells reduces the incidence of MN and apoptotic cells in MSC. Similar CM effect of GBM cells was noticed in MSC, whereas the CM of U87 cells increased the presence of MN in U373 and U251 implying on hierarchy among GBM cell lines.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	XI
Slovarček	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MATIČNE CELICE	3
2.2 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE	4
2.2.1 Viri mezenhimskih matičnih celic	5
2.2.2 Lastnosti, izolacija in diferenciacija mezenhimskih matičnih celic	5
2.2.3 Gojenje mezenhimskih matičnih celic v pogojih in vitro	6
2.2.4 Komunikacija matičnih celic z ostalimi celicami	7
2.2.5 Vloga mezenhimskih matičnih celic v telesu	8
2.2.6 Uporaba mezenhimskih matičnih celic v medicini	8
2.3 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI RAKAVIH CELIC IN TUMORJEV	9
2.4 MOŽGANSKI TUMORJI – GLIOMI	11
2.4.1 Multiformni glioblastom in invazivnost	12
2.4.2 Možnosti zdravljenja gliomov	15
2.4.3 Uporaba mezenhimskih matičnih celic pri zdravljenju gliomov	16
2.4.4 Tveganja uporabe mezenhimskih matičnih celic pri zdravljenju gliomov	17
2.5 PROLIFERACIJSKI TESTI	18
2.5.1 Protein Ki-67	18
2.5.2 Test MTT	19
2.6 TEST KROMOSOMSKE NESTABILNOSTI – TEST MIKROJEDER	19
2.7 APOPTOZA CELIC	22
3 MATERIAL IN METODE	24
3.1 KEMIKALIJE IN LABORATORIJSKA OPREMA	24
3.1.1 Kemikalije	24
3.1.2 Laboratorijska oprema	25

3.2	CELIČNE LINIJE	26
3.2.1	Humane mezenhimske matične celice	26
3.2.2	Celične linije GBM	27
3.3	PRIPRAVA RAZTOPIN IN GOJIŠČ	27
3.3.1	Priprava raztopin	27
3.3.2	Priprava gojišč za gojenje celičnih kultur in vitro	27
3.3.3	Priprava krovnih stekelc, prevlečenih s poli-L-lizinom	28
3.4	METODE DELA	29
3.4.1	Gojenje celičnih linij <i>in vitro</i>	29
3.4.1.1	Gojenje mezenhimskih matičnih celic	29
3.4.1.2	Štetje celic	30
3.4.1.3	Gojenje celičnih linij GBM	30
3.4.2	Shema poskusov	31
3.4.2.1	Izvedba poskusa za serumsko odvisnost	31
3.4.2.2	Proliferacijski test s Ki-67	32
3.4.2.3	Priprava poskusa za test kromosomske nestabilnosti	35
4	REZULTATI	37
4.1	CELIČNE LINIJE	37
4.1.1	Mezenhimske matične celice (MMC1, MMC2)	37
4.1.2	Glioblastomske celične linije (U87, U373, U251)	38
4.2	REZULTATI POSKUSOV	39
4.2.1	Serumska odvisnost	39
4.2.2	Barvanje na antigen Ki-67	41
4.2.2.1	Določanje vpliva celic U87 na rast in proliferacijo MMC	42
4.2.2.2	Določanje vpliva MMC na rast in proliferacijo celic U87	43
4.2.2.3	Določanje vpliva celic U87 na rast in proliferacijo celic U373 in U251	44
4.2.2.4	Določanje vpliva celic U373 in U251 na rast in proliferacijo celic U87	45
4.2.3	Kromosomska nestabilnost – test mikrojeder	46
4.2.3.1	Določanje vpliva celic U87 na prisotnost mikrojeder pri MMC	47
4.2.3.2	Določanje vpliva MMC na prisotnost mikrojeder pri celicah U87	48
4.2.3.3	Določanje vpliva celic U87 na prisotnost mikrojeder pri celicah U373 in U251	49
4.2.3.4	Določanje vpliva celic U373 in U251 na prisotnost mikrojeder pri celicah U87	50
4.2.4	Apoptoza	51
4.2.4.1	Določanje vpliva celic U87 na pogostost apoptoze pri MMC	52
4.2.4.2	Določanje vpliva MMC na pogostost apoptoze pri celicah U87	53
4.2.4.3	Določanje vpliva celic U87 na pogostost apoptoze pri celicah U373 in U251	54
4.2.4.4	Določanje vpliva celic U373 in U251 na pogostost apoptoze pri celicah U87	55
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	56
5.1	RAZPRAVA	56

5.1.1	Serumska odvisnost	56
5.1.2	Ovrednotenje proliferacije – barvanje Ki-67	58
5.1.2.1	Vpliv celic GBM na proliferacijo MMC, in obratno	58
5.1.2.2	Vpliv celic U87 na proliferacijo celic U373 in U251, ter obratno	59
5.1.3	Kromosomska nestabilnost	60
5.1.3.1	Vpliv celic GBM na pojav mikrojeder pri MMC, in obratno	60
5.1.3.2	Vpliv celic U87 na pojav mikrojeder pri celicah U373 in U251, ter obratno	61
5.1.4	Apoptoza	62
5.1.4.1	Vpliv celic GBM na pojav apoptoze pri MMC, in obratno	62
5.1.4.2	Vpliv celic U87 na pojav apoptoze pri celicah U373 in U251 ter obratno	62
5.2	SKLEPI	63
6	POVZETEK	64
7	VIRI	65
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Glavne značilnosti razredov glioblastomov	14
Preglednica 2: Uporabljene kemikalije	24
Preglednica 3: Uporabljeni laboratorijski orodji	25
Preglednica 4: Izvor mezenhimskih celičnih linij	26
Preglednica 5: Izvor celičnih linij GBM	27
Preglednica 6: Sestava gojišča za gojenje MMC	27
Preglednica 7: Sestava gojišča za gojenje U87, U373 in U251	28
Preglednica 8: Sestava eksperimentalnega gojišča	28
Preglednica 9: Priporočena gostota celic za nacepitev T25	31
Preglednica 10: Priprava 30 ml gojišča z različnim odstotkom seruma	32

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Diferenciacija MMC	6
Slika 2: Histološke rezine astrocitomov.	12
Slika 3: Mesto v možganih, kjer se lahko razvije glioblastom.....	13
Slika 4: Struktura MTT in njegov formazanski produkt	19
Slika 5: Nastanek mikrojeder.	21
Slika 6: Nastanek mikrojedra iz acentričnega fragmenta.	22
Slika 7: Mreža hemocitometra za štetje celic	30
Slika 8: Indirektne ko-kulture.....	33
Slika 9: Mezenhimske matične celice (MMC1), 100x povečava.....	37
Slika 10: Mezenhimske matične celice (MMC2), 100x povečava.....	37
Slika 11: Celice U373, 100x povečava.....	38
Slika 12: Celice U251, 100x povečava.....	38
Slika 13: Celice U87, 100x povečava.....	39
Slika 14: Odvisnost rasti celičnih linij od količine seruma v gojišču.....	39
Slika 15: Celice obarvane z barvilm Hoechst, 100x povečava	41
Slika 16: Celice po barvanju s protitelesom Ki-67, 100x povečava.....	41
Slika 17: Vpliv celic U87 na proliferacijo MMC.....	42
Slika 18: Vpliv MMC na proliferacijo celic U87.....	43
Slika 19: Vpliv celic U87 na proliferacijo celic U373 in U251.	44
Slika 20: Vpliv celic U373 in U251 na proliferacijo celic U87.	45
Slika 21: Celici z mikrojedrom, 100x povečava.....	46

Slika 22: Vpliv celic U87 na prisotnost mikrojeder pri MMC (a) in prikaz proliferacije celic med poskusom (b).....	47
Slika 23: Vpliv MMC na prisotnost mikrojeder pri celicah U87 (a) in prikaz proliferacije celic med poskusom (b).....	48
Slika 24: Vpliv celic U87 na prisotnost mikrojeder pri celicah U373 in U251 (a) in prikaz proliferacije celic med poskusom (b).	49
Slika 25: Vpliv celic U373 in U251 na prisotnost mikrojeder pri celicah U87 (a) in prikaz proliferacije celic med poskusom (b).	50
Slika 26: Apoptoza celic v celični kulturi, 100x povečava	51
Slika 27: Vpliv celic U87 na pogostost apoptoze pri MMC.....	52
Slika 28: Vpliv MMC na pogostost apoptoze pri celicah U87.....	53
Slika 29: Vpliv celic U87 na pogostost apoptoze pri celicah U373 in U251.....	54
Slika 30: Vpliv celic U373 in U251 na pogostost apoptoze pri celicah U87	55

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
AF	barvilo Aleksa Fluor (sekundarno protitelo)
ATCC	zbirka celičnih linij (angl. <i>American Type Culture Collection</i>)
BSA	albumini iz govejega seruma (angl. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CM	Kodicionirano gojišče (angl. <i>Conditioned Medium</i>)
CO ₂	ogljikov dioksid
DAPI	barvilo 4',6-diamidin-2-fenilindiol
dH ₂ O	destilirana voda
DMEM	Dulbeccov modificirano gojišče za gojenje celic (angl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	<u>dimetil sulfoksid</u> (angl. <i>dimethylsulfoxide</i>)
FBS	zarodni telečji/goveji serum (angl. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
GBM	možganski tumor (angl. <i>glioblastoma multiforme</i>)
IL	interlevkin
Ki-67	monoklonsko primarno protitelo proti proteinu Ki-67
kont	kontrola
MC	<u>matična celica</u>
MEM	osnovno gojišče za gojenje celičnih kultur (angl. <i>Minimum Essential Medium</i>)
MJ	<u>mikrojedro</u>
MMC	humana (človeška) <u>mezenhimska matična celica</u> (angl. <i>Mesenchymal stem cell; MMC</i>)
MTT	raztopina za kolorimetričen test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NMC	nevroepitelijska matična celica
nm	nanometer
PBS	fosfatni pufer s soljo (angl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
plošče BD	plošče za gojenje celic s 24 vdolbinami, proizvajalec Becton Dickinson
PS	<u>Penicillin streptomycin</u>
T25	plastenka za celične kulture s površino 25cm ²
TGF- β	Transformirajoči rastni dejavnik (angl. <i>Transforming growth factor</i>)
vrt./min	vrtljaji na minuto

SLOVARČEK

POJEM	RAZLAGA
Angiogeneza	Angiogeneza je fiziološki proces rasti novih žil iz že obstoječih žil s pomočjo angiogenih faktorjev. Angiogenza poteka tudi kot odgovor na tumorske celice in je pomembna terapevtska tarča pri zdravljenju malignih neoplazem.
Apoptoza	Apoptoza je eden od tipov programirane celične smrti. Proces apoptoze lahko sprožijo zunanji dejavniki (aktivatorji), ki se vežejo na membranske receptorje, ali pa znotrajcelični signali, ki delujejo na mitohondrije. Za normalno delovanje organizma je apoptoza nujno potrebna, saj se s tem odstranjujejo celice, ki so okužene, imajo poškodovano DNA, so rakasto spremenjene ali so odvečne (npr. pri razvoju organov pri zarodku). Odsotnost apoptoze pri odstranjevanju tovrstnih celic vodi v različna obolenja.
Astrocit	Celica zvezdaste oblike, ki je pri sesalcih večinoma prisotna v centralnem živčnem sistemu, kjer tvori razvejitev možganov in možganske žile; hkrati pa je eden izmed gradnikov krvno-možganske pregrade.
Benigen	Nenevaren, neškodljiv.
Celična linija	Definirana celična populacija, ki jo daljše časovno obdobje ohranjam v kulturi <i>in vitro</i> . Po navadi pri teh celicah pride do spontane transformacije oz. dediferenciacije v bolj primitivno obliko, kar podaljša življenjsko dobo celic.
Celična terapija	Zdravljenje s presaditvijo različnih celičnih vrst. Če gre za matične celice te večinoma usmerimo v razvoj končno diferenciranih celic, ki jih potrebujemo, da z njimi »popravimo« okvarjene celice ali tkiva. Terapija s celicami je poleg genske terapije in tkivnega inženirstva tretja vrsta naprednega zdravljenja.
Citokin	Citokini so topni izločki celic, ki omogočajo medcelično komunikacijo, spodbudijo imunski odziv in razmnoževanje celic. Nekateri jih delijo v tri skupine, t.j. limfokine (izločajo jih limfociti), interlevkine (v glavnem naj bi delovali na levkocite) in kemokine (ki naj bi posredovali kemotaksco med celicami), vendar je ta razdelitev dandanes neustrezna, ker imajo mnogi citokini mešano delovanje vseh treh skupin.
Diferenciacija (celic)	Proces, v katerem se manj specializirana celica razvije v bolj specializirano.
Domovanje MMC (angl. <i>MSC homing</i>)	Proces, pri katerem MMC kot odgovor na kemokine potujejo ven iz niš matičnih celic, migrirajo do mesta poškodbe, tam pa vdirajo v poškodovano tkivo.
Embrionalna matična celica	Pluripotentna linija matičnih celic, ki izhajajo iz zgodnjega zarodka (~5 dan), preden se tvorijo embrionalne plasti.
Fetalni goveji serum	Običajen dodatek k gojiščem za gojenje celic, ki se pridobiva iz seruma nerojenih telet. Vsebuje razne rastne dejavnike. Kot dodatek k gojiščem se uporablja zato, ker vsebuje malo protiteles in veliko rastnih faktorjev. Glavna komponenta je globularni protein serumski albumin (BSA), vsebuje pa tudi veliko drugih proteinov, ki ugodno vplivajo na preživetje, rast in proliferacijo celic v kulturi.
Gensko zdravljenje (genska terapija)	Gensko zdravljenje je vrsta naprednega zdravljenja. Z gensko terapijo umestimo zdrave in funkcionalne gene v celice osebe, ki ima te gene okvarjene zaradi določene bolezni.
Gliacelica	Podpora celica v centralnem živčnem sistemu.
Glioblastom	Najbolj maligna oblika gliomov, ki lahko nastane preko predhodno manj malignih vrst astrocitomov ali neposredno, posebno pri starejših bolnikih.

Herniacija v možganih	Stanje, ko so možgani, cerebrospinalna tekočina in krvne žile potisnjene ven iz običajnega mesta.
Invazija	Sposobnost širjenja, vdora (tumorskih) celic, v (normalno, zdravo) okoliško tkivo. Tudi splošen izraz za vdor, infiltracijo celic v tkivo. Celična invazija je na splošno pomemben dogodek v progresivni, nekontrolirani proliferaciji tumorskih celic.
In vivo	V živem; izraz se v naravoslovju uporablja za procese, ki potekajo znotraj živega organizma.
In vitro	Izven živega; izraz se v naravoslovju uporablja za poskuse in procese, ki potekajo zunaj živega organizma.
Ko-kulture	Gojenje dveh različnih celičnih linij skupaj, v istih pogojih, ločenih s filtrom, prepustnim za molekule, ne pa celice. Uporabljajo jih za ugotavljanje medsebojih celičnih učinkov.
Kondicionirano gojišče (angl. <i>Conditioned medium; CM</i>)	Gojišče, v katerem so rastoče celice izločile različne molekule, kot so: citokini, interlevkini in rastni faktorji.
Konfluенca	Zlivanje, preraščenost dna gojilne posodice s celicami. Če so celice konfluentne, pomeni, da so popolnoma prerasle dno platenke.
Kostni mozeg	Mehko tkivo, ki se nahaja zlasti v ploščatih kosteh, kot so medenica, prsnica, lobanja, rebra, hrbtnična vretenca in lopatica, ter v gobastem tkivu dolgih kosti (stegnenica, nadlahtnica). V kostnem mozgu poteka hematopoeza.
Malign	Celica oziroma skupina celic izgubi zmožnost strukturne diferenciacije, postanejo invazivne in tvorijo metastaze.
Matična celica (MC)	Matična celica (MC) je nediferencirana celica v živih bitjih, ki ima dve ključni lastnosti: lastnost samoobnavljanja in lastnost pluripotentnosti. MC se samoobnavlja z nesimetrično delitvijo, pri čemer nastaneta ena njej enaka in druga, bolj diferencirana hčerinska celica. Ta ima manjši razvojni potencial od prve, ker je bolj diferencirana. Samoobnavljanje omogoča vzdrževanje populacije matičnih celic v konstantnem številu.
Mezenhimska matična celica (MMC)	Mezenhimske matične celice spadajo med stromalne celice kostnega mozga in imajo dvojno vlogo: a) predstavljajo izvor celic nekrvotvornih tkiv in b) so hkrati hranilne in podporne celice za rast in diferenciacijo krvtovornih ali krvnih celic in ostalih tkiv, saj sintetizirajo različne komponente zunajceličnega matriksa in različne rastne dejavnike. So zelo uporabne za zdravljenje v regenerativni medicini, pa tudi za zdravljenje avtoimunskih bolezni. Največ se jih nahaja v kostnem mozgu.
Neoplazma	Nenormalna, nova rast tkiva.
Niša matične celice	Celično mikrookolje, ki nudi podporo in dražljaje, ki so nujno potrebni za ohranjanje samoobnovitvenega potenciala matičnih celic (MC). Poznanih je več vrst niš matičnih celic, ki se med seboj razlikujejo po celičnem in biokemičnem okolju. Znane so različne niše, npr. niše mezenhimskih MC ter posebne vrste niš rakavih MC.
Pasaža	Presaditev celic v celični kulturi; ponavadi presaditev opravimo, ko celice v kulturi popolnoma prerastejo dno gojitvene platenke (t.i. konfluentno stanje).
Plastičnost	Sposobnost tkivnih matičnih celic (MC odraslega), da se spremenijo v celico drugega kličnega lista ali da se spremenijo v odrasle celice drugega tkiva, kamor jih pred tem prenesemo. Te značilnosti pokažejo tkivne matične celice kot odgovor na fiziološke potrebe ali dražljaje.
Pluripotentna matična celica	Celica, sposobna tvoriti vse telesne celice, vključno z germinalnimi celicami, in nekaj ali vsa ekstraembrialna tkiva. Takšne so npr. embrionalne in mezenhimske matične celice.
Potentnost	Obseg možnosti za končno diferenciacijo celic. Poznamo toti-, pluri-, multi- in unipotentne (matične) celice.

Površinski označevalci	Proteini na površini celice, ki so značilni za določen tip celic. Zaznamo jih z uporabo barvil, z barvili označenih protiteles ali z drugimi detekcijskimi metodami.
Proliferacija (celična)	Podvojevanje celic, njihova rast in razvoj. Rast in delitev celic imenujemo tudi celični cikel, ki ima več faz. V fazi G1 se sintetizirajo različni encimi, potrebni za podvojevanje DNA. V naslednji fazi S se DNA oblikuje v dva enaka seta kromosomov. V tretji fazi G2 se sintetizirajo proteini mikrotubulov, potrebni za delitev (mitozo). V četrti fazi M pride do delitve jedra in citoplazme in nastanka nove membrane. Faza M; mitoza je sestavljena iz zaporedja profaze, prometafaze, metafaze, anafaze in telofaze, ki jim sledi citokineza (delitev citoplazme).
Rakava (tumorska) matična celica	Samoobnavljajoča se celica, ki je odgovorna za ohranjanje, rast in metastaziranje tumorja. Tumorske matične celice, ki jih je možno identificirati pri nekaterih levkemijah in čvrstih tumorjih, so potencialne terapevtske tarče pri zdravljenju raka, ker so najbolj odporne na terapijo.
Rastni dejavnik	Rastni dejavniki so molekule, ki delujejo preko specifičnih receptorjev na površini celice. Spadajo v skupino citokinov. Če se rastni dejavnik sprosti v kri, lahko deluje na oddaljene tarče (endokrini način delovanja), na sosednje celice (parakrini način delovanja) ali celo deluje tudi na samo celico, ki ga izloča (avtokrino delovanje).
(Replikativna) senescenca	Ireverzibilna izguba proliferativne sposobnosti celic, ki je ključna za preživetje.
Samoobnavljanje (samopomnoževanje)	Posebna sposobnost matične celice, da s celično delitvijo nastane vsaj ena hčerinska celica, ki je popolnoma enaka materinski in ima enako latentno sposobnost diferenciacije. Vzdrževanje matičnosti je rezultat sodelovanja številnih mehanizmov in izraženosti t.i. pluripotentnih genov. Celična delitev je ponavadi asimetrična in zato se druga potomka lahko usmeri v določeno smer razvoja.
Tkvno inženirstvo	Uporaba celic, biokemičnih dejavnikov, sintetičnih nadomestkov in inženirskeh metod za izboljšanje biološke funkcije poškodovanega tkiva oz. organa.
Transdeterminacija	Proces, pri katerem se prednike matične celice ene usmeritve nenadoma spremeni v celice druge prednike usmeritve, npr. iz mezodermalnih nastanejo ektodermalne prednike.
Transdiferenciacija	Proces, pri katerem se tkivne matične celice iz enega tkiva odraslega spremenijo (oz. diferencirajo) v specializirane celice drugega tkiva.
Transdukcija	Prenos gena iz ene v drugo bakterijo s pomočjo bakteriofaga (vrsta virusa). Z usmerjeno transdukcijo lahko prenesemo specifične gene v gostiteljev kromosom.
Transformacija	Sprememba v obliki, strukturi in funkciji. Maligna transformacija: sprememb normalne celice v maligno, ponavadi to pomeni, da celica pridobi sposobnost neskončnega pomnoževanja.
Tripsin	Encim, ki razgraje proteine. Velikokrat ga uporabljam za ločevanje celic v celični kulturi od podlage.
Tumor-supresorski geni	Geni, ki zaviralno regulirajo delitve celic, in s tem potencialno tudi razvoj tumorja. Mutacije v teh genih večinoma povzročijo maligno transformacijo celic in njihovo nenadzorovano delitev.

VIR: Rožman in Jež, 2010

1 UVOD

Najpogostejše bolezni človeške populacije v sodobnem svetu so rak, bolezni srca in krvožilnega sistema ter bolezni psihičnega izvora. Ne povzročajo jih mikroorganizmi in niso nalezljive, pa vendar njihova pogostost narašča. So posledica hitrega tempa življenja, napačnega načina prehranjevanja, premalo gibanja in stresa, ki je postal vsakdanji spremljavelec ljudi. Rak tako ostaja eden glavnih vzrokov smrtnosti in obolenosti po svetu. Če se bo trend nadaljeval, bo prav kmalu, glede na umrljivost, s prvega mesta izpodrinil srčno-žilna obolenja. Zato je veliko raziskav usmerjenih k iskanju novih in učinkovitejših zdravil za omejevanje te bolezni.

Tkvno inženirstvo, regenerativna medicina in celična terapija so multidisciplinarne vede, ki s svojim pristopom predstavljajo novo upanje v zdravstvu. Ponujajo možnost regeneracije poškodovanih tkiv in organov ter možnost povrnitve njihove normalne funkcije in strukture. Gre torej za ustvarjanje živih, funkcionalnih tkiv za zdravljenje poškodb tkiv ali organov, ki ne funkcionirajo več zaradi starosti, poškodb ali bolezni (Rada in sod., 2009).

Matične celice ohranjamamo v sebi vse življenje. Omogočajo nam, da se naša tkiva in organi, kljub številnim tkivnim poškodbam in okvaram, do katerih prihaja v vsakdanjem življenju, regenerirajo. V zadnjem desetletju je postalo jasno, da se nahajajo v vseh tkivih odraslega človeka, iz katerih jih je mogoče tudi izolirati. Z njimi lahko zdravimo določene degenerativne, rakave in druge bolezni. Mezenhimske matične celice (MMC; angl. *mesenchymal stem cells*), s katerimi sem izvajala poskuse, lahko izoliramo iz tkiv odraslega človeka, v našem primeru iz kostnega mozga. So sposobne pritrjevanja na podlago, razmeroma preprosto jih lahko gojimo, namnožimo ter ohranjamamo v nediferencirani obliki v pogojih *in vitro*. Njihovo pridobivanje tudi ni etično sporno. Lahko jih je gensko modificirati in delujejo imunosupresivno. Zaradi teh in drugih lastnosti predstavljajo velik up v tkivnem inženirstvu, genski terapiji in imunoterapiji.

Glioblastomi (GBM) so najpogostejša in najbolj maligna oblika možganskih tumorjev. Kljub modernim diagnostičnim metodam in zdravljenju je stopnja preživetja bolnikov s tako obliko tumorja majhna, predvsem zaradi visoke invazivnosti tumorskih celic. Popolno operativno odstranitev tumorja onemogoča infiltracijo glioblastomskega celica v okoliško možganovino, ki poteka kot invazija posamičnih tumorskih celic v zdravo možgansko tkivo (Jerič, 2010).

Z raziskavami na področju interakcij med mezenhimskimi matičnimi celicami in glioblastomskimi celičnimi linijami želimo pridobiti nove informacije glede njihovega odziva v direktnih in indirektnih ko-kulturah. Te informacije bodo pripomogle k razvijanju novih metod za zdravljenje GBM. Glioblastomi izločajo citokine (kemokine), zaradi katerih MMC aktivno migrirajo na mesta, kjer se tumor nahaja, in tam vdirajo v tumorsko tkivo (Kidd in sod., 2009). Zaradi te in drugih lastnosti bi bile MMC zelo uporabne v celični terapiji, kot dostavni sistem za različne protitumorske učinkovine (Nakamura in sod., 2004).

1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Osnovni namen diplomske naloge je bil ovrednotiti vpliv humanih mezenhimskih matičnih celic (MMC) dveh različnih donorjev na proliferacijo, kromosomska nestabilnost in apoptozo pri treh različnih glioblastomskeih celičnih linijah (GBM) in obratno, vpliv treh različnih linij GBM na MMC ter vpliv celic U87 na celice U373 in U251 in obratno. Vplive smo preverjali v indirektnih ko-kulturah in s kondicioniranim gojiščem (CM), ki ponazarja parakrino komunikacijo med celicami. V diplomski nalogi smo analizirali:

1. Vpliv količine seruma v gojišču na proliferacijo dveh klonov MMC (MMC1 in MMC2) in treh klonov GBM (U87, U373, U251).
 - Med skupinama celic MMC in GBM pričakujemo razlike v odzivu na vsebnost seruma v gojišču. MMC so bolj zahtevne in občutljive glede hranil za svojo rast in metabolizem, zato jih potrebujejo več. Celice GBM pa so prilagodljivejše in manj zahtevne, saj morajo svojo rast prilagoditi specifičnim pogojem v tumorju, kot je pomanjkanje kisika in hranil ter s svojo rastjo prehiteti normalne celice v tkivu.
2. Vpliv ko-kultur in kondicioniranih gojišč na proliferacijo celic.
 - Iz prejšnjih objav vemo, da celice GBM z izločanjem citokinov (kemokinov) privlačijo MMC, povečajo njihovo invazivnost in proliferacijo. Zato smo predvidevali, da se bo proliferacija MMC, ob prisotnosti celic in kondicijskega gojišča GBM, povečala. Glede na dosedanje rezultate raziskav, predvidevamo tudi, da humane MMC zmanjšajo proliferacijo celic GBM. Predpostavljam, da se bo to izkazalo tako v indirektnih ko-kulturah kot v poskusu s CM.
 - Pri vplivu celic U87 (GBM) na U251 in U373 (GBM) ter obratno smo postavili hipotezo, da lahko različne linije GBM, zaradi različne objavljene metabolne aktivnosti, različno delujejo med sabo na rast. Iz objav tudi vemo, da so *in vivo* tumorji sestavljeni iz mase heterogenih celic, ki se med sabo razlikujejo v hitrosti proliferacije. Zato tukaj predvidevamo, da bodo določene celice GBM vplivale na rast ostalih celic GBM, tako v ko-kulturah, kot v poskusu s CM *in vitro*.
3. Vpliv kondicioniranega gojišča celičnih linij na kromosomska nestabilnost (pojav mikrojeder; MJ) in pogostost apoptoze pri celicah.
 - Pri vplivu celic GBM na MMC pričakujemo spremembo števila MJ in pojava apoptoze, saj je znano, da imajo celice GBM zelo nestabilen genom. Iz objav vemo, da MMC potujejo na mesto poškodb in vnetja kjer aktivno sodelujejo pri regeneraciji tkiva, zato smo postavili hipotezo, da bodo MMC vplivale na pogostost pojavljanja MJ in apoptotičnih celic pri U87 (GBM).
 - Podobno smo postavili hipotezo pri celičnih linijah GBM, da bodo celične linije med seboj vplivale na prisotnost MJ in apoptotičnih celic.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MATIČNE CELICE

Celice, ki se v človeškem telesu ohranajo vse življenje in omogočajo, da se tkiva in organi obnavljajo, imenujemo matične celice (angl. *stem cells*; MC). So maloštevilne nediferencirane celice, po obliki podobne majhnim limfocitom, sposobne dolgotrajnega asimetričnega deljenja, pri čemer na eni strani tvorijo v procesu samoobnavljanja identične kopije celic, na drugi strani pa tvorijo nove linije bolj diferenciranih celic. Pri tem najprej nastanejo celice prednice (prekurzorji) specializiranih tkivnih celic in iz njih nato funkcionalne celice različnih tkiv (Bongso in Lee, 2005).

Matične celice se lahko razvijejo v različne vrste celic. Matične celice lahko razdelimo glede na njihovo sposobnost diferenciacije: na toti-, pluri-, multi- in unipotentne (Schöler, 2007):

- Totipotentne celice so se sposobne diferencirati v vse celične vrste, vključno s spermiji in jajčeci. Ob združitvi spermija z jajčno celico nastane zigota (ena sama embrionalna matična celica), ki se nato trikrat deli do 8 totipotentnih matičnih celic. Ko se te celice razdelijo naprej so že pluripotentne. V odraslih sesalcih in v človeku je tako več kot 200 različnih celičnih vrst, ki izvirajo iz ene same celice zigote oz. oplojenega jajčeca.
- Pluripotentne celice so se sposobne diferencirati v vse tri celične plasti (mezoderm, ektoderm in endoderm), ne pa v trofoblast, to je v del blastociste, ki se ugnezdi v steno maternice in se kasneje razvije v posteljico. Take so embrionalne matične celice (izhajajo iz zgodnjega zarodka ~5 dan) in mezenhimske matične celice.
- Multipotentne celice (tudi oligopotentne) so se sposobne diferencirati v več celičnih vrst, vendar ne v vse. Take so npr. mieloične krvotvorne matične celice.
- Unipotentne matične celice so se sposobne diferencirati le v eno celično vrsto. Imenujemo jih tudi celice prednice (progenitorji). Take so npr. predniške epitelne matične celice.
- Pomembna lastnost matičnih celic je plastičnost. To pomeni sposobnost prilagoditve matičnih celic, da jih lahko iz njihovega naravnega okolja presadimo v novo mikrookolje, kjer pridobijo lastnosti, ki ustrezajo novemu okolju. Matične celice so torej, poleg samoobnavljanja in diferenciacije, sposobne v določenih primerih celo preskočiti iz ene somatske linije v drugo (npr. iz mezoderma v endoderm). Plastičnost oz. spremenljivost matičnih celic je osupljiva in ima štiri sposobnosti (Krause, 2002; Martin-Rendon in Watt, 2003):

1. iz sposobnosti za dediferenciacijo, tj. razvoja odrasle ali linijsko usmerjene celice prednice v bolj primitivne oblike,
2. iz sposobnosti za transdeterminacijo; tj. spremembe iz ene v drugo prednisko celično linijo,
3. iz sposobnosti za transdiferenciacijo, tj. sposobnosti, ki omogoči diferencirani celici, da pridobi fenotipske značilnosti druge diferencirane celice,
4. ter celo iz sposobnosti za fuzijo z drugimi, že diferenciranimi celicami v tkivu, iz česar lahko nastane popolnoma nov tip celic .

Matične celice lahko osamimo iz zarodka na stopnji morule in blastociste (embrionalne matične celice), popkovnične krvi novorojenca ozziroma posteljice in iz kostnega mozga odraslega človeka. Šele v zadnjem desetletju pa je postal jasno, da se nahajajo tudi v različnih drugih tkivih odraslega človeka in jih imenujemo tudi tkivne matične celice ali mezenhimske matične celice (Can, 2008). Odgovorne so za obnavljanje odmrlih celic in popravljanje tkivnih poškodb. Mezenhimske matične celice najdemo v epitelu, prebavilih, skeletnih mišicah, očeh, jetrih, dojki, zobni pulpi, koži, lasnih mešičkih, periferni krvi, maščobnem tkivu, testisih, prostati, v ovarijih ... (Zipori, 2005; Strbad in Rožman, 2005). Tako v vsakem organu obstaja mesto ali niša, ki je bogata z mezenhimskimi matičnimi celicami. Niša MMC je celično mikrookolje, ki nudi podporo in dražljaje, ki so nujno potrebni za ohranjanje samoobnavljanja in sposobnosti diferenciacije matičnih celic, in hkrati uravnava njihovo aktivnost (Ho in Wanger, 2007). Pomemben vir MC je kostni možeg (KM), kjer se nahajajo mezenhimske MC, krvotvorne MC in hemangioblasti. Te različne vrste MC je mogoče iz KM najprej izolirati, nato pa označiti glede na njihove označevalce in tako ločiti. Označevalci so določene celične površinske molekule, imenovane CD (angl. *Cluster of Differentiation*). Tako pridobljene in ločene celice so primerne za raziskave, uporabo v regenerativni medicini, za tkivno inženirstvo in za celično zdravljenje (Strbad, 2004).

2.2 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE

Mezenhimske matične celice (angl. *mesenchymal stem cells*; MMC) so torej pluripotentne celice, izolirane iz tkiva odraslega človeka in se lahko diferencirajo v različne celične linije (kostne, hrustančne, maščobne, mišične celice). Prva sta jih leta 1996 opisala Friedenstein in Petrakova, ki sta jih izolirala iz kostnega mozga. So redke in eno najdemo na 10.000–100.000 drugih celic kostnega mozga. Friedenstein je prvi razvil metode za njihovo izolacijo in gojenje (Jackson in sod., 2007; Strbad, 2004).

Mednarodni svet za tkivni inžiniring je postavil tri minimalne kriterije, s pomočjo katerih lahko definiramo MMC (Dominici in sod., 2006):

1. sposobnost pritrditve na podlago gojitvene plastenke,
2. 95 % prisotnost izražanja za MMC specifičnih označevalcev,
3. sposobnost diferenciacije *in vitro* v osteoblaste, adipocyte in hondroblast.

2.2.1 Viri mezenhimskih matičnih celic

Mezenhimske matične celice se nahajajo v nišah različnih tkiv, kjer tkivna posebnost določenega mikrookolja vpliva na specifične razlike v njihovi kvaliteti in sposobnosti odzivanja na različne okoljske signale. Pomembnost izvora celic se odraža tako v starostno kot bolezensko pogojenih razlikah med izoliranimi kloni mezenhimskih matičnih celic (Motaln, 2008). Glavni, najbogatejši in najpogostejši vir MMC je kostni možeg. MMC spadajo med stromalne celice kostnega možga (Locatelli in sod., 2007). MMC so prisotne tudi v popkovnični krvi (Kern in sod., 2006). Postopek odvzema popkovnice in popkovnične krvi je za mater in otroka neboleč, enostaven in varen. Poročajo tudi o prisotnosti MMC v amnijski membrani in tekočini. Vsebovali naj bi več MMC kot popkovnična kri (Alberts in sod., 2007). Nenazadnje pa so z raziskavami uspeli dokazati prisotnost MMC tudi v možganih, pljučih, periferni krvi, epiteliju, prebavilih, skeletnih mišicah, očeh, jetrih, periferni krvi, zobni pulpi, koži, lasnih mešičkih, maščobnem tkivu, modih, jajčnikih in nekaterih drugih organih (Jackson in sod., 2007).

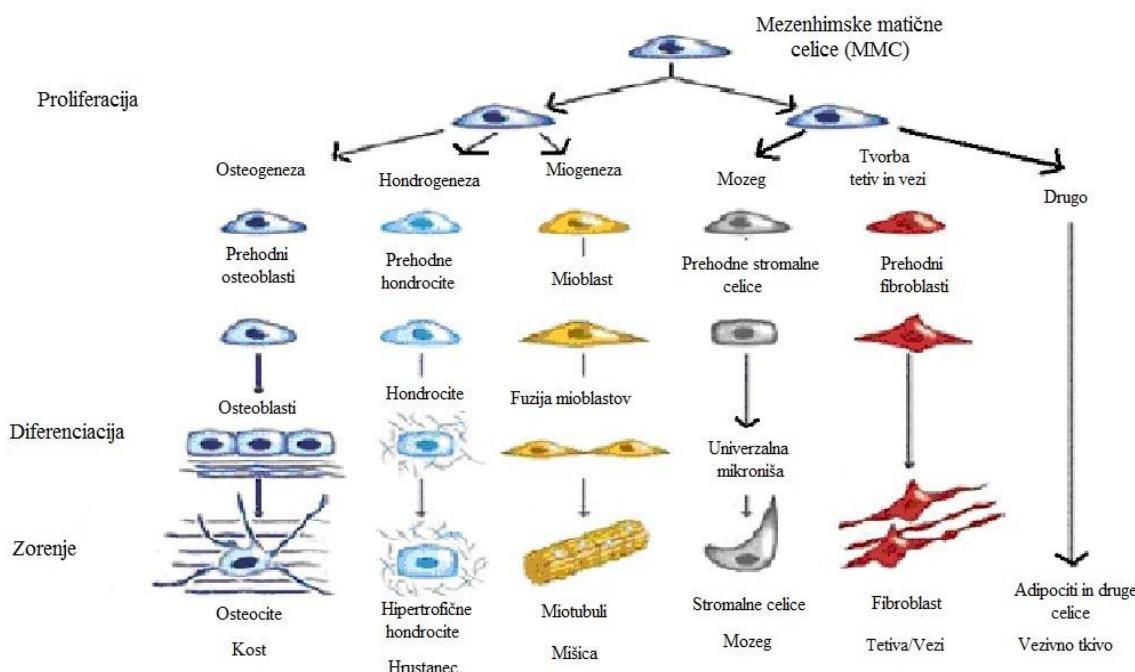
2.2.2 Lastnosti, izolacija in diferenciacija mezenhimskih matičnih celic

Mezenhimske matične celice so morfološko in fenotipsko zelo raznolika populacija matičnih celic v kostnem možgu. Celice so dolge in ozke, vretenaste oblike, vsebujejo veliko, okroglo jedro s poudarjenim jedrcem, ki je obkroženo s kromatinskim delci, zato je jedro dobro vidno. V citoplazmi je manjša količina Golgijevih aparatov, zrnatega endoplazmatskega retikuluma, mitohondrijev in ribosomov. Celice v pogojih *in vitro* rastejo v monosloju, pritrjene na podlago, imajo orientirano rast, ko pa dosežejo večjo konfluenco, se začnejo prepletati. Po doseženi maksimalni zapoljenosti gojitevne površine se zaradi kontaktne inhibicije njihova rast ustavi in potrebno jih je presaditi (Netter, 1987; Brighton in Hunt, 1991; Strbad, 2004).

MMC določamo s pretočno citometrijo glede na njihove specifične označevalce (površinske antogene). MMC so negativne za tri krvotvorne označevalce CD14, CD34, CD45 in antogene CD4, CD8, CD11a, CD15, CD16, CD25, CD31 (endoteljski označevalec), CD33, CD49b, CD49d, CD49f, CD50, CD62e, CD62l, CD62p, CD80, CD86, CD106, CD117, kadherin V, glikoforin A, kompleks HLA-DR in HLA razreda II. Pozitivne pa so na CD10, CD13, CD29 (β -integrin), CD44, C49e ($\alpha 5$ -integrin), CD54 (ICAM-1), CD58, CD71, CD73 (SH3), CD90, CD105, CD146, CD166, izražajo HLA razreda I in CD123, ter različno izražajo FLK1 (KDR), CD133/1 in CD133/2. Pri nižjih pasažah je stopnja izražanja površinskih antigenov večja kot pri višjih pasažah, kar kaže na to, da se v telesu verjetno nahaja heterogena populacija MMC (Alberts in sod., 2007; Gang in sod., 2004; Kogler in sod., 2006; Rubio in sod., 2005; Wang in sod., 2005). Ker noben način izolacije ni optimalen, so kulture MMC vedno kontaminirane in ne moremo govoriti o 100 % homogenosti populacije MMC. Zato ne moremo zagotovo trditi, katere vrste celic se nahajajo v kulturi (Jackson in sod., 2007), lahko pa to preverimo z metodami celičnega sortiranja, kot je pretočna citometrija.

Ker imajo MMC sposobnost, da se v kulturi prilepijo na plastično podlago, jih je razmeroma preprosto osamiti iz vzorcev in namnožiti do zadostnega števila, potrebnega za raziskave in klinično uporabo. Z ustreznimi rastnimi dejavniki in citokini lahko te celice

vzdržujemo v nediferenciranem stanju, v katerem tudi po številnih pasažah ohranijo plastičnost in potentnost. MMC so se v pogojih *in vivo* in *in vitro* sposobne diferencirati v celice kosti, hrustanca, celice srčne in skeletne mišice, nevronske celice, celice tetiv ter maščobno in vezivno tkivo (Pittenger in sod., 1999). To omogoča, da jih uporabimo pri zdravljenju poškodb mezenhimskega tkiva; tj. pri zlomih kosti, osteoporosi, obrabi hrustanca ipd. Nekatere raziskave kažejo, da se lahko MMC po transplantaciji diferencirajo in vgradijo v kosti, mišice, pljuča, možgane, srce, jetra, gastrointestinalni trakt in krvotvorni sistem (Anjos-Afonso in sod., 2004). Alviano in sod. (2007) pripisujejo MMC iz amnijske membrane najvišji diferenciacijski potencial, na drugem mestu pa so MMC izolirane iz popkovnične krvi, ki imajo višji potencial kot MMC, izolirane iz kostnega mozga (Goodwin in sod., 2007).



Slika 1: Diferenciacija MMC (Hematopoietic and mesenchymal stromal cell pathway, 2010)

2.2.3 Gojenje mezenhimskih matičnih celic v pogojih *in vitro*

Pravilna izbira sestave gojišča za gojenje MMC je zelo pomembna, saj vpliva na proliferacijski in diferenciacijski potencial celic. DMEM je široko uporabno osnovno gojišče, ki ga je priporočila svetovna organizacija FDA (angl. *Food and Drug Administration*) (Kogler in sod., 2006). Pomembna je tudi kakovost plastike za ustrezno adhezijo celic pri izolaciji in razmnoževanju MMC (Sotiropoulou in sod., 2006).

Na razvojni potencial MMC oz. njihovo sposobnost diferenciacije vpliva tudi vir, iz katerega pridobimo celice, število pasaž in konfluенca ter način shranjevanja celic. Proliferacijski potencial MMC je močno odvisen tudi od starosti (20–60 let) (Stolzing in sod., 2008) in

zdravja donorja. Pri starejših donorjih so ugotovili znižanje proliferacijskega potenciala. Merili so tudi oksidativne spremembe ter senescenco in povzeli, da prisotne oksidativne spremembe vplivajo na kakovost MMC. S starostjo v donorju prihaja tudi do krajevanja dolžine telomernih regij pri donorskih MMC (Graakjear in sod., 2007). Pri višjih pasažah ali konfluenci pride do delne izgube oz. spremembe diferenciacijskega potenciala MMC. Po 8–15 pasažah MMC namreč postanejo senescentne in se prenehajo deliti (Motaln in sod., 2010; Ho in Wagner, 2007).

2.2.4 Komunikacija matičnih celic z ostalimi celicami

V vsakem organu je lokacija ali niša, bogata s tkivnimi matičnimi celicami, ki prebivajo v podpopulaciji stromalnih celic, ki kontrolirajo njihovo aktivnost. MMC v svoje okolje izločajo številne topne faktorje, kot so citokini, interlevkini in rastni faktorji, s pomočjo katerih komunicirajo z drugimi celicami v tkivu (niši), npr. z osteoklasti in stromalnimi celicami (Wilson in Trumpp, 2006).

MMC v pogojih *in vitro* izločajo rastne faktorje, kot so epiteljski kemotaktični dejavnik za nevtronfilce-78 (angl. *epithelial neutrophil-activating peptide-78*, ENA-78), kolonije stimulirajoči faktor za granulocite in makrofage (angl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), z rastjo povezani onkogeni (angl. *growth related oncogene*), IL-1 β , IL-6, IL-8, kemoatraktantni protein 1 za monocite (angl. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1), oncostatin M (OSM), vaskularni endotelijski rastni dejavnik (angl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), fibroblastni rastni dejavnik FGF-4 (angl. *human fibroblast growth factor*), FGF-7, FGF-9, granulocitni kemotaktični protein-2 (angl. *granulocyte chemotactic protein-2*, GCP-2), vezavni protein za inzulinu podoben rastni dejavnik tipa 1 IGFBP-1 (angl. *insulinlike growth factor-binding protein*), IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, protein, ki inducira interferon (angl. *interferon inducible protein-10*, IP-10), makrofagni vnetni protein-3a (angl. *macrophage inflammatory protein-3a*, MIP-3a), makrofagni zavirajoči faktor (angl. *macrophage-inhibiting factor*), osteoprotegerin, PARC (angl. *pulmonary and activation regulated chemokine*), PIGF (angl. *phosphatidylinositol glycan class F*), TGF- β 2, TGF- β 3, tkivni zaviralec metaloproteinaz TIMP-1 (angl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*) in TIMP-2. Osnovni profil izločanja citokinov je med različnimi viri MMC enak, spremenijo se le koncentracije. Na ravni izločanja citokinov vpliva morfologija MMC; agregati MMC ali sferoidi izločajo do 20-krat več VEGF, FGF- β , angiogenina, prokatepsina B, IL-11 in kostnega morfogenetskega proteina-1 (BMP-1) v primerjavi s celicami, gojenimi v monosloju (Liu in sod., 2005; Chen in sod., 2008; Kinnaird in sod., 2004; Nagaya in sod., 2004; Tang in sod., 2005).

Motaln in sod. (2010) so dokazali, da celice GBM v pogojih *in vitro* povečajo proliferacijo in invazijo MMC. Glioblastomi izločajo citokine (kemokine), zaradi katerih MMC aktivno migrirajo na mesta, kjer se tumor nahaja, in tam vdirajo v tumorsko tkivo (Kidd in sod., 2009). Zaradi teh lastnosti bi bile MMC zelo uporabne v celični terapiji, kot dostavnici sistem za različne protitumorske učinkovine (Nakamura in sod., 2004).

2.2.5 Vloga mezenhimskih matičnih celic v telesu

Mezenhimske matične celice imajo v telesu dvojno vlogo:

1. Pomembne so pri ustvarjanju niše krvotvornih matičnih celic, predstavljajo matične celice za nekrvotvorna tkiva ter sintetizirajo različne komponente zunajceličnega matriksa in različne rastne faktorje (Locatelli in sod., 2007).
2. MMC potujejo na poškodovana mesta in aktivno sodelujejo v regeneraciji tkiva. Z izločanjem citokinov in rastnih faktorjev lahko vzpostavijo homeostazo in zmanjšajo lokalno vnetje ter se diferencirajo v enega ali več celičnih tipov, ki so v tkivu poškodovani (Bianco in sod., 2001; Pittenger in sod., 1999; Spees in sod., 2003).

2.2.6 Uporaba mezenhimskih matičnih celic v medicini

Za uporabo v regenerativni medicini je bilo identificiranih in preučevanih že veliko različnih tipov matičnih celic. Med najbolj raziskane sodijo embrionalne matične celice, ki imajo podobne terapevtske lastnosti kot MMC (Karussis in sod., 2008), vendar je njihov terapevtski potencial omejen zaradi različnih dejavnikov (Mallam in sod., 2010). Pri vbrizgavanju embrionalnih matičnih celic se pojavi povečana možnost za nastanek tumorja ter možnost, da bo pacientov imunski sistem zavrnil vbrizgane matične celice (Karussis in sod., 2008; Mallam in sod., 2010). Raziskave embrionalnih matičnih celic in njihova uporaba so tudi etično sporni, saj se jih izolira iz oplojenih zarodkov (Karussis in sod., 2008; Yang in sod., 2010). Zaradi teh omejitev imajo MMC prednost, saj so etično sprejemljive in jih je razmeroma lahko izolirati ter gojiti v pogojih *in vitro*.

Nediferencirane MMC je mogoče diferencirati v najrazličnejša tkiva (Slika 1). Pri tem ima uporaba lastnih (avtolognih) MMC veliko prednosti pred uporabo tujih (alogenih), saj pri njihovi presaditvi ne pride do zavrnitvene reakcije. Pri uporabi alogenih MMC pa imajo presadki enako usodo kot presajeni tuji organi, ki jo določa tkivna skladnost med darovalcem in prejemnikom. MMC so imunosupresivne, kar pomeni, da zmanjšajo imunski odgovor, zato so tudi primerne za uporabo pri alogenih transplantacijah (Leung in sod., 2006; Ryan in sod., 2005).

Mezenhimske matične celice uporabljajo za zdravljenje različnih napak, bolezni in poškodb, kot so srčno-žilne bolezni, poškodbe hrbtenjače, pri poškodbah kosti in hrustanca ter avtoimunskih bolezni (Caplan, 2010). V zadnjih letih veliko raziskav poteka na področju uporabe MMC za zdravljenje multiple skleroze (Guo in sod., 2010; Capello in sod., 2009). Na različnih vrstah živali potekajo tudi predklinične raziskave bioloških učinkov MMC pri slatkorni bolezni, melanomu, avtoimunske encefalomielitisu, akutni ledvični odpovedi, srčnemu infarktu, zavrnitvi ob presaditvi kože, artritisu, poškodbi mrežnice, akutni poškodbi pljuč, odpovedi jeter, itd. (Ucelli in sod., 2008).

2.3 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI RAKAVIH CELIC IN TUMORJEV

Rak je splošno ime za obsežno skupino različnih bolezni, katerih glavna značilnost je nenadzorovana rast spremenjenih, rakavih celic. V patologiji raka je osnovna in najpomembnejša delitev na benigni (nerakotvoren) in maligni tumor (rakotvoren). Benigni ali primarni tumor ne kaže niti morfoloških niti kliničnih znakov invazije v okoliška tkiva ali tvorbe zasevkov (metastaz), kar pomeni, da je omejen le na mesto nastanka. Maligni tumor pa ima sposobnost invazivnega vraščanja v sosednja tkiva ali razširjanja preko obtočil in/ali limfnega sistema v oddaljena tkiva, kjer tvori metastaze oziroma sekudarne tumorje (Ramzi in sod., 1999).

Poznamo tri glavne modele nastanka tumorja: model klonalne evolucije, stohastičen model in hierarhičen model nastanka tumorja. Razvila se je tudi kombinacija modela klonalne evolucije in hierarhičnega modela, kjer sta obe teoriji združljivi in se celo dopolnjujeta. Hipoteza o klonalni evoluciji tumorskih populacij pravi, da tumor nastane iz enake vrste celic (hipoteza o monoklonalnem razvoju trdi, da tumor nastane iz ene same poškodovane (mutirane) celice). Stohastičen model razлага, da se tumor lahko razvije iz vsake celice ter da se v tumorju lahko nahajajo različni celični tipi, ki imajo sposobnost tvorbe tumorja (metastaziranja), odvisno od mikrookolja, v katerem se nahajajo, in njihovi interakciji z ostalimi celicami v niši. Hierarhičen model temelji na rakavih matičnih celicah (tumorske matične celice), ki v asimetričnih celičnih delitvah tvorijo matičnim celicam podobne celice in heterogeno populacijo tumorskih celic. Te tumorske celice so zato tudi genetsko enake. Rakave matične celice so definirane kot rakave celice, ki so po lastnostih podobne normalnim matičnim celicam in so lahko vir vseh celičnih tipov, ki se nahajajo v določenem tumorju. Domnevajo, da so rakave matične celice ločena populacija v tumorju in povzročajo ponovitve ter metastaziranje tumorjev. Rakave matične celice lahko izvirajo iz različnih populacij celic. Nastanejo lahko iz normalnih matičnih celic, iz progenitorskih celic, diferenciranih normalnih celic ali pa diferenciranih tumorskih celic, ki se dediferencirajo do matične celice. Ugotovili so, da imajo rakave matične celice številne poti in gene, enake normalnim matičnim celicam, ter da le-te igrajo osnovno vlogo v razvoju tumorja (Bjerkvig in sod., 2009; Reya in sod., 2001; Bjerkvig in sod., 2005).

Nastanek rakave celice lahko razdelimo na tri stopnje (Novakovič in sod., 2009):

- **Iniciacija:** med podvojevanjem DNA se kopijo mutacije, katerih posledica je nenadzorovano izražanje protoonkogenov in/ali inaktivacija tumor-supresorskih genov;
- **Promocija:** podvojujejo se celice z mutacijami, s čimer se kopijo nove mutacije, katerih število raste sorazmerno s številom celičnih delitev;
- **Progresija:** izrazijo se maligne lastnosti: tvori se tumorsko krvožilje.

Tumorske celice imajo nekaj skupnih lastnosti (Novakovič in sod., 2009):

- intenzivne delitve (neoplazija): celice postanejo zaradi mutacij komponent v celični signalizaciji manj odvisne ali popolnoma neodvisne od rastnih faktorjev za rast, preživetje in delitev, v nekaterih primerih pa celice same proizvajajo rastne faktorje, in s tem stimulirajo lastne delitve, kar imenujemo avtokrina rastna stimulacija;
- genetska nestabilnost: kopičenje mutacij, ki ovirajo točno podvojevanje dednega materiala, popravljanje napak ter sprememb na ravni kromosomov (npr. prelomi);
- neodvisnost od kontaktne inhibicije – pomeni, da migracija in proliferacija celic ni preprečena kljub tvorbi stikov s sosednjimi celicami;
- »nesmrtnost« – zaradi reaktivacije telomeraz se lahko celice neomejeno delijo, saj telomeraze konstantno vzdržujejo dolžino telomernih regij na koncu kromosomov;
- odpornost proti apoptozi – zaradi mutacij, ki prizadenejo komponente kontrolnih točk celičnega cikla se proces programirane celične smrti kljub napakam ne aktivira;
- angiogeneza – rakave celice spodbujajo rast krvnih žil, s čimer omogočajo dovod hrane in kisika, odvod ogljikovega dioksida in presnovkov ter metastaziranje;
- manjša adhezivnost – rakaste celice so nenormalno invazivne, v veliki meri zaradi spremenjenih stikov celica–zunajcelični matriks in celica–celica;
- povečano izločanje proteaz – k invazivnosti prispeva tudi izločanje proteaz, ki razgrajujejo proteine v medceličnini, kar omogoča prodiranje celic v sosednja tkiva;
- metastaziranje – rakave celice lahko vdrejo v druga tkiva in tam tvorijo nove metastaze.

Različni tumorigeni dejavniki postopoma spreminjajo lastnosti celic v smeri manjše odzivnosti na signale, ki regulirajo rast, smrt (apoptozo) in diferenciacijo celic. Signalni geni tako vplivajo na vstop celice v celični ciklus za spodbujanje celične delitve. V normalnih celicah so to protoonkogeni, ki so v malignih celicah mutirani v onkogene (npr. c-myc). Normalno te gene kontrolirajo tisti, ki so sposobni zavreti celico v celični delitvi in jih imenujemo tumorsupresorski geni (npr. p53). V primeru mutacije protoonkogena ali tumorsupresorskih genov se preneha kontrola nad celičnim ciklom in zavrt je tudi proces apoptoze, ki v zdravem organizmu skrbi za celično smrt (Pecorino, 2008).

2.4 MOŽGANSKI TUMORJI – GLIOMI

Na splošno možganske tumorje delimo (Šuštar, 2010):

a) glede na celični tip, ki prevladuje:

- **ependimomi** izvirajo iz ependimalnih celic,
- **oligodendrogliomi** izvirajo iz oligodendrocitov,
- **astrocitomi** izvirajo iz astrocitov,
- **mešani gliomi** (npr. oligoastrocitomi) so sestavljeni iz več vrst celic glije,

b) na podlagi patološke ocene:

- gliomi **nizke stopnje** niso anaplastični, so benigni,
- gliomi **visoke stopnje** so anaplastični, pogosto infiltrirani v okoliško možganovino in so maligni,

c) glede na lokacijo v možganih:

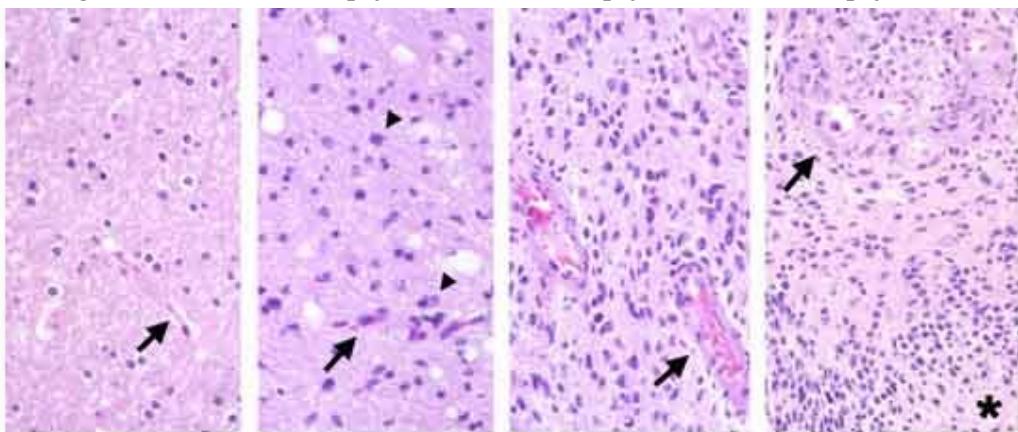
- **supratentorialni gliomi** se nahajajo v velikih možganih, prizadenejo pa večinoma odrasle,
- **infratentorialni gliomi** se nahajajo v malih možganih, večinoma prizadenejo otroke.

Astrocitome najpogosteje delimo dalje po lestvici Svetovne zdravstvene organizacije (angl. *WHO*) (Louis in sod., 2007):

- stopnja I: **pilocitni astrocitom** in **subependimom** (2 % vseh astrocitomov); sta počasi rastoča, benigna in pogojno ozdravljuva,
- stopnja II: **astrocitom** (8 % vseh); počasi rastoč, invaziven, navadno benigen, lahko se razvije v maligno obliko ali napreduje v višjo stopnjo, najpogosteje prizadene otroke,
- stopnja III: **anaplastični astrocitom** (20 % vseh); malign, cilj zdravljenja je kirurška odstranitev čim večjega dela tumorja brez poškodb ključnih nevroloških funkcij,
- stopnja IV: **glioblastom** (ali **multiformni glioblastom – GBM**); najpogostejši, najbolj invaziven možganski tumor.

Ključni proces pri napredovanju astrocitomov po lestvici Svetovne zdravstvene organizacije iz stopnje I do stopnje IV je angiogeneza (Slika 2), ki jo spreminja nekroza, najpogosteje okoli hipoksičnih regij. Prisotnost hipoksičnih regij in rast tumorja vodi v povečano izražanje proangiogenih faktorjev. Nanje vplivajo tudi genetske spremembe (Brat in sod., 2003).

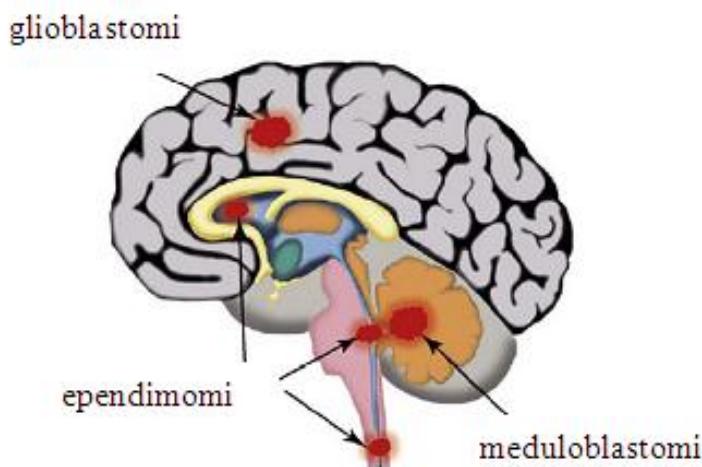
a) zdravi možgani b) astrocitom (stopnja II) c) anaplastični astrocitom (stopnja III) d) glioblastom (stopnja IV)



Slika 2: Histološke rezine astrocitomov. (a) S puščico je označena belina v zdravih možganih. (b) V astrocitomih posamezne tumorske celice vdrejo v tkivo centralnega živčnega sistema (trikotniki), struktura beline je identična kot v zdravih možganih (puščica). (c) Število tumorskih celic se poveča, njihova oblika je nepravilna, opaziti je mitozo. Angiogeneza je pospešena, stene kapilar so stanjšane (puščica). (d) V GBM je prisotna mikrovaskularna proliferacija (puščica), pogosto pa je opazna tudi mikrovaskularna hiperplazija okoli mest nekroz (*) (Brat in sod., 2003).

2.4.1 Multiformni glioblastom in invazivnost

Glioblastom (GBM) največkrat nastane v predelu velikih možganov (lat. *Cerebrum*) (Slika 3), redkeje ga najdemo v možganskem deblu (lat. *Truncus cerebri*) in hrbitenjači (lat. *Medulla spinalis*). Navadno se hitro širi v druge dele možganov, izven možganov pa običajno ne tvori metastaz (Bruce in Kennedy, 2009).



Slika 3: Mesto v možganih, kjer se lahko razvije glioblastom (Hadjipanayis in Van Meir, 2009)

Poznamo dve obliki glioblastomov. Primarni GBM predstavljajo večino GBM, najpogosteje prizadenejo odrasle osebe, starejše od 50 let. Zrastejo *de novo*, kar pomeni, da ni dokazov, da je bila prej prisotna kakšna druga manj maligna oblika. So izredno maligni, bolniki brez zdravljenja imajo v povprečju še tri mesece življenja. Sekundarni GBM pa so značilni za osebe, mlajše od 45 let. Razvijejo se iz astrocitomov. Bolniki z začetnim astrocitomom imajo boljšo prognозo in lahko ob uspešnem zdravljenju živijo tudi več kot deset let od prvega diagnosticiranja astrocitoma. Če pa bolniku odkrijejo GBM, ki se je razvil iz astrocitoma, lahko živi še največ eno leto (Ohgaki in Kleihues, 2007).

Prvi diagnostični znaki, ki jih lahko opazimo na histoloških preparatih, so nekroze, pleomorfne celice (različnih oblik) in celična jedra ter mikrovaskularna proliferacija (brstenje kapilar) (Holland, 2000). GBM navzven kažejo enak histološki fenotip, vendar biološki znaki (npr. rast in diferenciacija) nakazujejo razlike. Različni podtipi GBM so lahko posledica različnih izvornih celic (Fan in sod., 2007). GBM so tako poimenovali zaradi velike heterogenosti, saj ga sestavlja veliko različnih celičnih tipov. Nekaterih od teh celičnih tipov imajo zvezdasto obliko in izražajo GFAP (angl. *glial fibrillary acidic protein*) in beljakovino S100, drugi celični tipi pa so majhne in nediferencirane okrogle celice, pomešane s stromalnimi elementi (astrociti, mikroglia) (Hadjipanayis in Van Meir, 2009). Razlike so tudi znotraj skupine primarnih in sekundarnih GBM zaradi molekularne heterogenosti znotraj in v okolini tumorja (Phillips in sod., 2006). GBM so na podlagi razlik v izražanju genov (med drugim receptorja epidermalnega rastnega faktorja (angl. *epidermal growth factor receptor*; EGFR), nevrotromina 1 (angl. *neurofibromin 1*; NF1) in PDGFRA/IDH1 (angl. *platelet-derived growth factor receptor/isocitrate dehydrogenase*) razvrstili v štiri razrede: pronevralni, nevralni, klasični in mezenhimski GBM (Preglednica 1). Med njimi ima nevralni, ki izraža genski profil, podoben diferenciranim možganskim celicam, najboljšo prognозo. Tudi zdravljenje je odvisno od razreda, v katerega je GBM uvrščen.

Preglednica 1: Glavne značilnosti razredov glioblastomov (Phillips in sod., 2006; Verhaak in sod., 2010)

	PRONEVRALNI	NEVRALNI	KLASIČNI	MEZENHIMSKI
Histološki razred	razred WHO III ali razred WHO IV z ali brez nekroz	razred WHO IV z ali brez nekroz	razred WHO IV z vidnimi nekrozami	razred WHO IV z vidnimi nekrozami
Morfologija celic	astrocit ali oligodendrocyti	astrocit ali oligodendrocyti	astrociti	astrociti
Oblika	primarni GBM, ki lahko napreduje v mezenhimski razred	primarni GBM, ki lahko napreduje v mezenhimski razred	primarni GBM, ki lahko napreduje v mezenhimski razred	primarni GBM ali preoblikovan pronevrálni, nevrálni ali klasični GBM
Starost bolnikov	večina mlajših od 40 let	starejši od 50 let (povprečna starost 60 let)	starejši od 50 let (povprečna starost 55 let)	starejši od 50 let (povprečna starost 58 let)
Prognoza	dobra (12 mesecev)	dobra (14 mesecev)	slaba (6 mesecev)	slaba (3 mesecev)
Histološki označevalci	Olig2, DLL3, BCAN	Olig2, DLL3, TOP2A	PCNA, TOP2A	CHI3L1/YKL40, CD44, VEGF
Tkvina podobnost	možgani odraslih	možgani odraslih	HMC, limfoblasti	kost, hrustanec, gladko mišičevje, endotelij, dendritične celice
Biološki proces	nevrogeneza	nevrogeneza	proliferacija	angiogeneza
Analogne možganske celice	nevroblasti	nevroblasti	NMC in/ali migrirajoče celice	NMC
Kromosomske spremembe	brez sprememb	brez sprememb	trisomija kromosoma 7 in delecija kromosoma 10q	podvojen kromosom 7, monosomija kromosoma 10
Aktivirana signalna pot	Notch	Notch	Akt	Akt

Poškodbe DNA, ki se izražajo v kromosomske spremembah, kot so nenormalna oblika kromosomov, izguba dela kromosoma (delecija), podvojitve (duplicacija), translokacije, inverzije in druge spremembe, so glavni razlog za nastanek raka. Zaradi različnih vzrokov, kot so izmikanje regulaciji celičnega cikla, neobčutljivost na rastne inhibitorne signale, izogibanje celični smrti in nesposobnost staranja, pride do prekemerne delitve in kopiranja celic (Hanahan in Weinberg, 2000). Genetsko ozadje GBM se razlikuje med primarnimi in sekundarnimi GBM. Pri obeh je najpogostejsa izguba heterozigotnosti na kromosому 10q; daljši ročici desetega kromosoma. Ta mutacija je specifična za GBM in jo redko najdemo pri drugih tipih gliomov. Za celice primarnega glioblastoma (pa tudi rakave celice na splošno) je značilno izrazito povišano izražanje EGFR (Ichimura in sod., 1998; Von Deimling in sod., 2000). EGFR je transmembranski protein (receptor), ki vsebuje

zunajcelični del, ta pa predstavlja vezavno mesto za vezavo rastnih faktorjev, kot sta epidermalni rastni faktor EGF (angl. *epidermal growth factor*) in transformirajoči rastni faktor TGF α (angl. *transfroming growth factor alpha*). Pojavlja se tudi mutacija v PTEN-intracelulazni fosfatazi, ki je ključni člen v signalni poti, ki omogoča supresijo tumorskih genov. Za sekundarne GBM pa sta značilni delecija in/ali zamenjava v p53 tumorsupresorskem genu ter amplifikacija ali prekomerno izražanje gena *PDGF- α* (Ohgaki in Kleihues, 2007).

Invazija in metastaziranje tumorjev je glavni razlog za smrt pacientov z rakom ter danes predstavlja zahtevno znanstveno in klinično vprašanje. Multiformni glioblastom lahko označimo kot agresivno in invazivno neoplazmo. Glavni problem konvencionalnega zdravljenja (operacija, radioterapija, kemoterapija) je, da kljub fizični odstranitvi tumorja ne odstranijo popolnoma vseh tumorskih celic, saj le-te invadirajo v okoliško tkivo. Zato so raziskave usmerjene ne le v uničenje glavne tumorske mase, ampak tudi tumorskih celic, ki se razpršijo globoko v normalno okoliško možganovino (Bexell in sod., 2010).

2.4.2 Možnosti zdravljenja gliomov

V tumorju najdemo zelo heterogeno populacijo celic: maligne celice z različnimi mutacijami, imunske celice, fibroblaste in endotelne celice, ki tvorijo ožilje tumorja. Usmerjeno zdravljenje raka torej cilja na različne tarčne celice v tumorju. Večina obstoječih načinov zdravljenja je usmerjena proti tumorskim celicam. Za uspešno zdravljenje je potrebno uničiti tiste tumorske celice, ki so sposobne celične delitve. Takih celic (tumorskih matičnih celic) je v tumorju do 20 %. Za popolno ozdravitev je potrebno odstraniti vse do zadnje, drugače lahko tumor ponovno izraste (Serša, 2009). Ker posamezne celice GBM infiltrirajo v okoliško možganovino, je zdravljenje bolnikov zelo oteženo. Cilj zdravljenja je zato zagotoviti bolniku čim boljšo kakovost življenja. Terapija zajema kirurško odstranitev, ki zaradi same narave tumorja ne more biti popolna, ter kombinacijo obsevanja in kemoterapije. Preživetje je odvisno od starosti bolnika (mlajši bolniki živijo dlje), ter od velikosti in tipa tumorja. Smrt bolnika je posledica velikosti tumorja, herniacije centralnega živčnega sistema (vkleščenje/izbočenje možganov) in prekinitev ključnih elementov živčnega sistema, potrebnih za življenje (Bruce in Kennedy, 2009).

Dandanes razvijajo nove, učinkovitejše in bolniku prijaznejše načine zdravljenja GBM (Bexell in sod., 2010):

- imunološki pristop z monoklonskimi in poliklonskimi protitelesi, ki bi direktno inhibirala rast tumorja in/ali povzročil celično citotoksičnost,
- genska terapija, pri kateri bi s pomočjo (npr. retrovirusnega) prenosa vnesli letalne gene v tumorske celice,
- uporaba virusnih vektorjev, ki bi se na tarčnem mestu pomnoževali in posledično povzročili lizo tumorskih celic.

Slabost teh pristopov je, da so v pogojih *in vitro* zelo uspešni, medtem ko *in vivo* niso, saj se celice ne morejo prosto razširjati in zato ne morejo migrirati k tumorju ali najti posameznih infiltriranih celic. Zato tukaj dobijo prednost MMC. Migracijske sposobnosti transduciranih MMC omogočajo učinkovitejšo dostavo genov v tumor v primerjavi z vbrizganjem virusnega vektorja (Miletic in sod., 2007). MMC selektivno migrirajo na področje poškodb in vnetij, kjer so vključene v obnovo tkiva (Wojakowski in sod., 2008). Ker gliomi z izločanjem mnogih angiogenih in vnetnih citokinov (IL-8, TGF- β 1, NT-3,...) ponazarjajo poškodbo, specifično privlačijo MMC, da prodrejo v tumor (Birnbaum in sod., 2007; Loebinger in Janes, 2010). V pogojih *in vivo* so MMC, izolirane iz kostnega mozga, uspešno naselile tumorje (Aboody in sod., 2000; Nakamizo in sod., 2006). Raziskave na miškah so pokazale, da obsevanje tumorja poveča migracijo vbrizganih MMC do tumorja, saj se migracija MMC vedno poveča na obsevana mesta (Klopp in sod., 2007). Obsevanje povzroča povečanje vnetne komponente, ki MMC privlačijo k tumorjem (Bexell in sod., 2010). Dokazano je tudi, da kondicionirano gojišče celic GBM (enako kot ko-kulture celic GBM in MMC) poveča invazijo MMC (Motaln in sod., 2010). Pri podganah (*in vivo*) so MMC tudi zmanjšale velikost tumorja (Nakamizo in sod., 2006; Nakamura in sod., 2004). Ker MMC potujejo k gliomom in se vanje infiltrirajo, predstavljajo pomemben člen pri oblikovanju strategije, s katero bi do tumorskih celic dostavili protirakave učinkovine (Loebinger in Janes, 2010).

2.4.3 Uporaba mezenhimskih matičnih celic pri zdravljenju gliomov

Zaradi lastnosti MMC so možnosti njihove uporabe pri zdravljenju gliomov (Bexell in sod., 2010) naslednje:

- Uporaba v genski terapiji

Gre za prenos specifičnega gena do tumorskih celic (transdukcija), kjer nanje specifično vplivajo. Z vnosom terapevtskega gena v tarčno tkivo se inducira izražanje tumorsupresorskih genov, utiša se izražanje dominantnih onkogenov, spodbudi imunski odziv, aktivira encime za nastanek citotoksičnih produktov, deluje antiangiogeno ali onkolitično (Pecorino, 2008). V začetnih raziskavah pri zdravljenju gliomov so uporabili gen timidin kinaze virusa Herpes simplex (HSV-tk), ki v tarčnih celicah spremeni predhodno vnesen ganciklovir v njegovo toksično obliko, ta potem zavira sintezo DNA, kar vodi v celično smrt (Pulkkanen in Yla-Herttuala, 2005). Terapevtski geni, ki so se izkazali za učinkovite, so še: tumor-supresorski gen p53, anti-sense oligonukleotidi in siRNA-molekule, ki s specifično vezavo na tarčno mRNA onkogena zavirajo njegovo izražanje, geni za interlevkine, HLA-B7 in MHC, ki stimulirajo protirakavi imunski odgovor (Palmer in sod., 2006).

- MMC kot prenašalke citokinov

MMC so uporabne za dostavo imunomodulatornih citokinov, ki spodbujajo gostiteljev protitumorski imunski odziv. Zaviranje tumorske rasti so dokazali s številnimi imunomodulatornimi snovmi, kot so: interleukin-2 (Nakamura in sod., 2004), interleukin-12 (Elzaouk in sod., 2006; Hong in sod., 2009), interleukin-18 (Xu in sod., 2009), interferon- α (Sato in sod., 2005), interferon- β (Studeny in sod., 2002) in CXC3CL1 (Xin in

sod., 2007). Terapevtski učinek gre pogosto pripisati povečani tumorski infiltraciji protitumorskih imunskih celic, kot so: CD4⁺ in CD8⁺ T celice ter naravne celice ubijalke (Nakamura in sod., 2004; Xin in sod., 2007).

- MMC kot prenašalke onkolitičnih virusov

Glavna ovira pri uporabi direktnih prenašalcev onkolitičnih virusov je visoka imunogenost virusnih delcev. Preden jih lahko uporabimo za antitumorsko delovanje, je potrebno onkolitične viruse nevtralizirati z imunološko reakcijo (Yamamoto in Curiel, 2010). Da bi rešili ta problem, so raziskave usmerjene v razvoj celičnih vektorjev za prenos onkolitičnih virusov (Power in Bell, 2007). Z uporabo celic kot prenašalcev bi virus dostavili naravnost v tumor, in ga s tem zaščitili pred gostiteljevim imunskim sistemom. MMC bi tako lahko uporabili kot prenašalke onkolitičnega adenovirusa (CRAd), ki bi ga zaradi svoje usmerjene migracije prenesle v tumor in do posameznih celic, kjer bi se sprostil in tako okužil tumorske celice (Sonabend in sod., 2008). Terapevtski učinek onkolitičnega adenovirusa, ki so ga do tumorskih celic prenesli s pomočjo MMC, je bil dokazan *in vivo* v poskusih na miškah, ki so jim vsadili človeški gliom (Komarova in sod., 2006; Yong in sod., 2009).

- Zaviranje angiogeneze tumorjev

Odkritje, da pri intratumorski implantaciji MMC kolonizirajo tudi ožilje tumorja, je pokazalo novo terapevtsko tarčo, posebej za dobro ožiljene tumorje, med katere spada tudi multiformni glioblastom (Bexell in sod., 2009). Novo nastalo ožilje tumorja je poglavitno za njegovo rast in preskrbljenost s snovmi, zato bi MMC lahko uporabili kot dostavni mehanizem za antiangiogene učinkovine, ki bi delovale na kapilare in žile rastočega tumorja, in s tem zavrle njegovo rast. Pri ciljnem uničenju tumorskega endotelija in tumorskih pericit se je pokazal zaviralni učinek pri rasti tumorja (Bergers in sod., 2003). Zadnje raziskave kažejo možnost, da bi lahko intratumorsko implantirane MMC (izražajo podobne markerje kot pericite) delovale kot tumorske pericite. Te sodelujejo pri ožiljanju in vzpostavitvi pretočnih kapilar za preskrbo tumorja, pri tem pa bi to imelo tudi pozitivno stran, saj bi se tako povečal pretok krvi po kapilarah tumorja in s tem tudi dotok učinkovitih protitumorskih imunskih celic (Hamzah in sod., 2008), kar bi prav tako vodilo v zmanjšanje tumorja.

2.4.4 Tveganja uporabe mezenhimskih matičnih celic pri zdravljenju gliomov

Glavni namen implantiranih MMC naj bi bila migracija in dostava terapevtskih substanc do tistih delov tumorja, ki so pri operaciji nedostopni. Problem predstavljajo predvsem celice, ki so se infiltrirale v okoliško možganovino in so lahko novo žarišče tumorja. Preden bi protirakave strategije, ki temeljijo na MMC, začeli uporabljati v kliničnih terapijah, je potrebno identificirati in čim bolj zmanjšati vsa tveganja, ki se ob tem pojavljajo. Celice je za raziskave in klinično uporabo potrebno namnožiti do zadostne količine. Pri gojitvi in namnoževanju celic pa eno od tveganj predstavlja gojiteni medij, ki vsebuje FCS, saj vsebuje nedefinirano mešanico proteinov, rastnih faktorjev, hormonov, aminokislín, itd. Zato je uporaba FCS pri gojenju celic, genov in tkivno-inženirskeih produktov zelo tvegana. Podjetja razvijajo alternative, med drugim tudi sistem gojenja

MMC v gojišču brez FBS. Tveganja uporabe MMC pri kliničnih aplikacijah so še (Bexell in sod., 2010):

- maligna transformacija MMC: pri dolgotrajni kultivaciji v pogojih *in vitro* maligno transformirajo,
- sprememba fenotipa MMC v fibroblastom podobne tumorske celice in pospešena rast tumorja,
- spremenjene imunomodulatorne lastnosti MMC bi lahko zavrele antitumorski imunski odgovor,
- fuzija MMC s tumorskimi celicami, kar lahko potencialno privede do povečane rasti, odpornosti proti zdravilom ter invazije tumorskih celic.

2.5 PROLIFERACIJSKI TESTI

Pri izolaciji celic iz tkiv, gojenju celic, uporabi v poskusih, gojenju za klinične aplikacije, *in vivo* diagnostiki, ipd. je potrebno stalno preverjanje rasti, napredovanja, diferenciacije ter fenotipskih lastnosti opazovanih celic. MMC se že uporablja za zdravljenje nekaterih obolenj, so pa tudi obetajoč kandidat za uspešnejše zdravljenje invazivnih in agresivnih tumorjev, predvsem multiformni glioblastom, katerega celice nenadzorovano invadirajo v okoliško možganovino in tam tvorijo nove neoplazme. Proliferacijski testi merijo hitrost rasti celic. Že sam osnovni potencial se med celičnimi linijami razlikuje. S testi pa lahko ugotavljamo spremjanje rasti (pozitivno ali negativno) ob določenih pospeševalnih ali zaviralnih faktorjih.

2.5.1 Protein Ki-67

Pri enem od testov kot označevalec uporablja protein Ki-67. Je nehistonski protein, ki ga najdemo v jedru celice in je točno povezan s celično proliferacijo. V človeškem genomu se gen za ta protein nahaja na kromosому 10q25. Obstajata dve izomorfni oblici proteina velikosti 395 in 320 kDa. Izražanje gena se skozi celični cikel spreminja (Smith in sod., 2005). Med interfazo lahko protein zaznamo samo znotraj jedra, medtem ko se v mitozi večina beljakovin preseli na površino kromosomov. Dejstvo, da je beljakovina prisotna v vseh aktivnih fazah celičnega cikla (G1, S, G2, med mitozo), med fazo mirovanja celice (G0) pa je ni, predstavlja ta protein odličnega označevalca za ugotavljanje rasti neke celične populacije (Scholzen in Gerdes, 2000).

Protitelo Ki-67 se uporablja tudi v prognostične namene pri rakavih obolenjih. Z njim ugotavljajo proliferacijski indeks tumorjev, ki sovpada z velikostjo tumorjev ali stopnjo diferenciacije (Brown in Gatter, 2002). Tumorske celice imajo spremenjeno izražanje onkogenov in tumor-supresorskih genov ter so sposobne zaobiti apoptozo. Te celice izražajo več proteina Ki-67, ker se kar naprej delijo – proliferirajo. Ki-67 se uporablja za zgodnje odkrivjanje tumorjev, napoved poteka bolezni in za spremeljanje odziva na terapijo (Scholzen in Gerdes, 2000; Smith in sod., 2005).

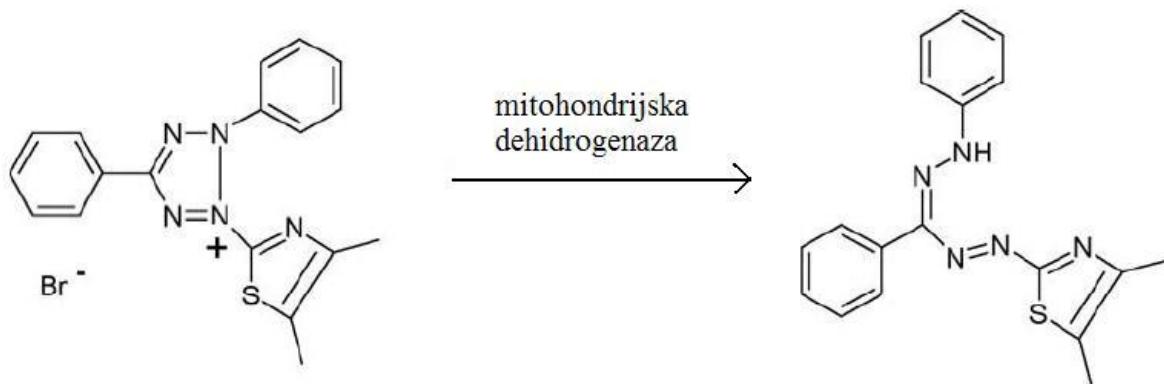
S proliferacijskim označevalcem lahko ob spremeljanju proliferacije MMC merimo tudi nastop senescence. Shibata je dokazal, da postopen upad proliferacijskih sposobnosti MMC vodi v nastop senescence. Senescentne celice so negativne na proliferacijski marker Ki-67 in pozitivne na marker senescence (aktivnost encima beta-galaktozidaza) (Shibata in sod., 2007).

2.5.2 Test MTT

Test MTT je enostavna, kvantitativna in natančna kolorimetrična metoda za določevanje števila celic, ki ga je opisal Mossman (1983). Uporabljam ga, kadar hočemo določiti vpliv določene snovi, elementa, gojišča ali citotoksičnega elementa na celično proliferacijo.

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) je rumena vodotopna snov, ki jo mitohondrijska dehidrogenaza metabolno aktivnih celic reducira v vijoličaste nevodotopne kristale formazana (Slika 4). Ti so topni v dimetilsulfoksidu (DMSO), izopropanolu in drugih organskih topilih. Zveza med količino nastalega formazana in številom živih celic je pri homogeni populaciji v optimalnem območju linearja in specifična za vsako celično linijo. Metoda pa je predvsem primerna za celice, ki rastejo v enem sloju ali v suspenziji (Sever, 2007).

Glavna prednost tega testa je hitrost. Test lahko odčitamo že nekaj minut po dodatku topila, v katerem se formazan raztaplja. Sprememba barve je opazna tudi s prostim očesom, kar je zelo koristno, če rezultate potrebujemo takoj. Test pokriva zelo široko območje gostote celic, iz česar je razvidno, da test lahko zazna zelo majhno število živih celic (Mossman, 1983).



Slika 4: Struktura MTT in njegov formazanski produkt (Greiner Bio-One, 2011)

2.6 TEST KROMOSOMSKE NESTABILNOSTI – TEST MIKROJEDER

Ljudje smo izpostavljeni najrazličnejšim rakotvornim (karcinogenim) dejavnikom, kot so kemikalije, radiacija, virusi in drugo. Glavne stopnje v procesu nastajanja raka so iniciacija (začetek), napredovanje in širjenje tumorskega tkiva. Začetek raka zaznamujejo poškodbe DNA v celici ali populaciji celic. Če taka poškodba ni popravljena, lahko vodi v genetske

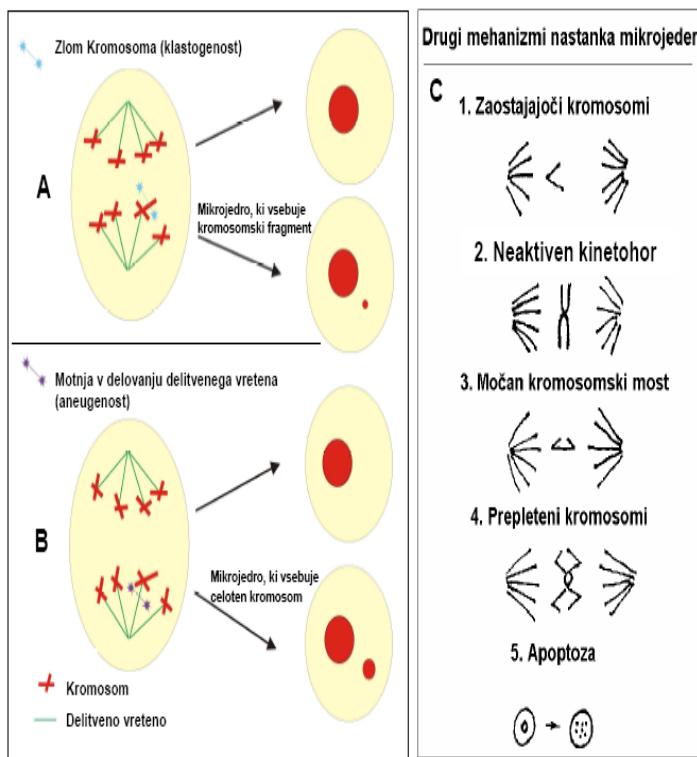
mutacije. Rast celic z genetskimi mutacijami privede do stopnjujoče se genomske nestabilnosti ter spremembe v izražanju genov, zaradi česar se razvijejo v tumorske celice (Pitot, 1989). Proces nastanka raka torej lahko opišemo kot kopiranje sprememb v genih, ki regulirajo celično homeostazo, kot so onkogeni, tumorsupresorski geni, geni, ki regulirajo apoptozo in geni za popravljanje DNA (Stanley, 1995).

Kromosomska nestabilnost je posledica poškodb DNA, ki se izrazi na kromosomski ravni. Študije, ki to preučujejo, so pomemben del genetske toksikologije, saj so kromosomske mutacije pomemben element pri nastanku raka. Test mikrojeder je postal ena od prednostnih metod za ocenjevanje poškodb dednega materiala, saj z njim lahko zanesljivo merimo tako kromosomske poškodbe, kot njihove izgube. V osnovi test z uporabo morfoloških kriterijev lahko meri genotoksičnost in citotoksičnost: kromosomske poškodbe, izgube kromosomov, kromosomska reorganizacija (nukleoplazmatske povezave), zaviranje celične delitve, nekrozo in apoptozo (Fenech, 2000).

Za uspešno in varno uporabo MMC v kliničnih aplikacijah je potrebno pozornost usmeriti tudi v njihovo genomsко/kromosomsко stabilnost, saj bi v nasprotnem primeru lahko implantirane MMC same postale maligna neoplazma. Znano je, da 30 % MMC, ki vstopijo v fazo senescence, kaže v kariotipu trisomijo 8. kromosoma (dodaten kromosom) (Rubio in sod., 2005). Pri 20. pasaži MMC postanejo poliploidne (predvsem tetraploidne), kasneje pa aneuploidne (nenormalno število kromosomov; več ali manj) (Izadpanah in sod., 2008).

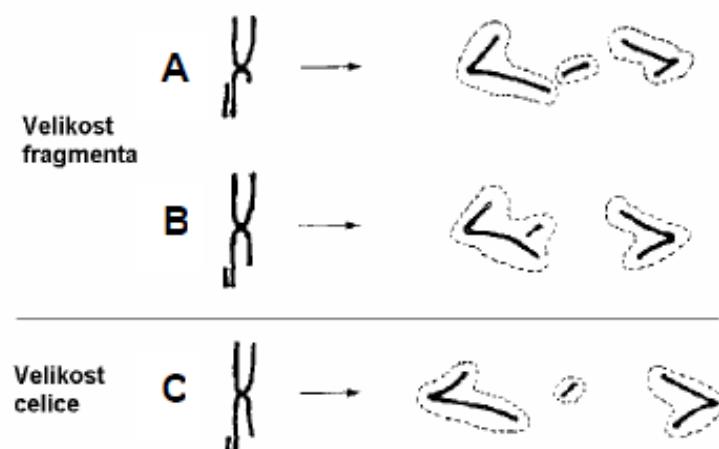
Mikrojedro je izvenjedro telo kromatinskega materiala, ki je posledica:

1. zloma kromosoma – klastogenost (Slika 5A),
2. motenega delovanja delitvenega vretena – aneugenost (Slika 5B),
3. različnih mehanskih vzrokov kromosomskih zlomov in izmenjav (Slika 5C: 1–4),
4. apoptoze (Slika 5C: 5).



Slika 5: Nastanek mikrojedra. A – zlom kromosoma; B – moteno delovanje delitvenega vrečna; C – različni mehanski vzroki kromosomskih zlomov in izmenjav (1: prepočasno anafazno potovanje kromosoma, ki ostane zunaj jedra, 2: neaktivnost kinetohora (skupek beljakovin na centromeru), 3: močan kromosomski most, 4: prepletenost kromosomov, 5: apoptoza) (prirejeno po Heddle in sod., 1991).

V prvem primeru mikrojedro vsebuje kromosomski fragment, ki mu manjka centromer, zato se imenuje acentrični fragment, v drugem pa je v mikrojedro vključen celoten kromosom. Običajno je mikrojedro, ki vsebuje celoten kromosom, večje od tistega, ki vsebuje samo fragment (Slika 5A in Slika 5B) (Heddle in sod., 1991).



Slika 6: Nastanek mikrojedra iz acentričnega fragmenta. Velikost fragmenta in velikost celice lahko vplivata na to, ali se bo fragment vključil v hčerinsko jedro ali bo postal mikrojedro. A – večji fragment v majhni celici postane mikrojedro, B – majhen fragment se v majhni celici vključi v nastajajoče glavno jedro; C – majhen fragment v veliki celici postane mikrojedro (Heddle in sod., 1991).

Fragment brez centromera (odsotnost kinetohora) in kromosom, ki ni pripet na delitveno vreteno, v anafazi celične delitve ne moreta usmerjeno potovati na pol celice, kjer se kasneje oblikuje novo jedro. Zato ostaneta zunaj glavnega jedra, kar je lahko odvisno od velikosti fragmenta (ali kromosoma) in velikosti celice. Manjši fragment se v majhni celici lažje vključi v nastajajoče glavno jedro (Slika 6B), večji fragment pa v isti celici bolj verjetno postane mikrojedro (Slika 6A). Podobno manjši fragment v veliki celici običajno ostane zunaj glavnega jedra in postane mikrojedro, saj v večji celici kromosomi v anafazi prepotujejo daljšo razdaljo in je verjetnost, da bo odlomljeni fragment v bližini novonastajajočega jedra, majhna (Slika 6C). Vsi acentrični fragmenti ne postanejo mikrojedra po prvi celični delitvi, ampak se nekateri podvojijo in postanejo mikrojedra v drugi ali eni od naslednjih celičnih delitev (Heddle in sod., 1991). Kadar se kromosom (ali fragment) ne vključi v novo nastalo jedro in ga v telofazi celične delitve obda jedrna membrana, postane mikrojedro. Kromosom se nato odvije in postopoma prevzame morfologijo jedra v interfazi (Fenech, 2000).

2.7 APOPTOZA CELIC

Aptotoza je najpogostejsa in dobro definirana oblika programirane celične smrti, ki je nujna za embrionalni razvoj, delovanje imunskega sistema in vzdrževanje homeostaze tkiv večceličnih organizmov (Jacobson in sod., 1997). Med apoptozo pride do razpada jedra in razpada citoplazme v telesca, obdana z membrano (t.i. apoptotska telesa). Apoptotske celice vsebujejo skupk jedrnih fragmentov brez normalnega jedra (Babič, 2008). V nepravilno podvojeni ali poškodovani celici se inducira pot programirane celične smrti in tako prepreči nadaljnje podvojevanje, ki bi privedlo do kopiranja poškodb. Rakave celice so razvile sposobnosti izogibanja apoptotskim mehanizmom, zato se kljub poškodbam neomejeno delijo. Okvare na poti celične smrti so poglavitne za razvoj raka. Čeprav je odpornost proti apoptizi tesno povezana s tumorigenezo, se lahko smrt celic aktivira tudi preko neapoptotskih poti, kot so nekroza in avtofagija (Okada in Mak, 2004).

Mutacije v proapoptotskem tumorsupresorskem genu p53 so najpogosteje genetske napake pri človeškem raku. Gen p53 kodira jedrni fosfoprotein, ki se v vseh normalnih celicah nahaja v nizki koncentraciji (Lai in sod., 2007). Gen p53 kontrolira izražanje proteina p21. Če gen p53 mutira, ne more več uspešno nadzorovati sestavljanja DNA in posledično primanjkuje proteina p21, ki bi se vezal s CDK2 in bi kot »signal stop« zaustavil nadaljnjo delitev celice. Zato se celice delijo nekontrolirano in tvorijo tumor (The p53 tumor..., 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 KEMIKALIJE IN LABORATORIJSKA OPREMA

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 2: Uporabljene kemikalije

Kemikalija	Proizvajalec
PBS, 10x	PAA Laboratories
DMEM, D5921,1x	Sigma
MEM (rdeči), 1x	Biochrom AG
FBS	Biochrom AG, Nemčija
L-glutamin, 2 mM	PAA Laboratories, Avstrija
Penicilin/ streptomycin	PAA Laboratories, Avstrija
Na piruvat, 100 mM	Gibco, Invitrogen, ZDA
Neesencialne aminokisline	Sigma
Tripsin-EDTA, 0,25 %, 1x	Gibco
Poli-L- lizin, 100 µg/ml	Sigma
Destilirana voda	NIB
Metanol	Sigma, ZDA
Triton	Sigma
BSA	Sigma
Primarno protitelo proti Ki- 67	Cahbiochem
Sekundarno protitelo proti Ki-67 (AF 488 anti rabbit)	Invitrogen, ZDA
Barvilo Hoechst, 5 µg/ml	Sigma
Vkllopni reagent	Invitrogen, ZDA
Etanol	RDH, Nemčija
MTT	Sigma
DMSO	Sigma
Ocetna kislina	Sigma
Akridinoranž	Invitrogen, ZDA

3.1.2 Laboratorijska oprema

Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Brezprašna celična komora – laminarij	Iskra, Slovenija
Inkubator s 5 % CO ₂ , 37 °C	Kambič, Slovenija
Tehtnica	Železniki, Slovenija
Vodna kopel, 37 °C	Precision Scientific Inc
Centrifuga	Tehtnica Železniki PLC-322
Centrifugirke (15 ml)	Corning 430791
Centrifugirke (50 ml)	Corning 430829
Digestorij	Koetterman, Nemčija
Invertni svetlobni mikroskop	Reichert-Jung, Avstrija
Fluorescentni mikroskop Eclipse E800	Nikon, Japonska
Plastenke za celične kulture s perforiranim zamaškom 25 cm ²	Corning, ZDA
Plastenke za celične kulture s perforiranim zamaškom 75 cm ²	Corning, ZDA
Plošče za gojenje celic (24 vdolbin)	Falcon, Francija
Inserti za plošče (24 vdolbin), 0,4 µm membrana	Becton Dickinson, Francija
Mikrotitrske plošče za gojenje celic (96 vdolbin)	Costar, ZDA
Kriogene viale (2 ml)	Costar, ZDA
Nastavki za pipete (0,1–10 µl)	Costar, ZDA
Nastavki za pipete (10–100 µl)	Costar, ZDA
Nastavki za pipete (100–1000 µl)	Costar, ZDA
Pipete (2, 10, 20, 200, 1000 µl)	Biohit
Avtomatska pipeta	IBS, Integra Biosciences
Stripete (5, 10, 25, 50 ml)	Costar, ZDA
Mikrocentrifugirke (epice) (1 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Costar, ZDA
Objektna stekla	Brand
Krovna stekelca (premer 12 mm)	Brand
Pinceta	NIB
Hemocitometer	Brand, Nemčija
Hladilnik	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalna skrinja (-20 °C)	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalna skrinja (-80 °C)	Angelantoni scientifica
Aluminijasta folija	NIB
Filtri 0,20 mm	Corning, Nemčija
Čaše	Duran, Schott
Brizge (10, 50 ml)	BD Plastik
Plastenke (250 ml)	Corning, ZDA
Parafilm	American National Can. TM, ZDA

se nadaljuje

nadaljevanje

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Stresalnik	Biosan, ZDA
Digitalni fotoaparat	Nikon, Coolpix 995
Spektrofluorimeter GENios	Tecan, Salzburg, Avstrija

3.2 CELIČNE LINIJE

Celicam, ki so predhodno izolirane iz tkiv, moramo zagotoviti ustrezne pogoje, da lahko preživijo tudi zunaj organizma, v pogojih *in vitro*. Z ustreznim hranilnim gojiščem, ki je sestavljeno iz hranilnih snovi, rastnih faktorjev in antibiotikov, zagotovimo vse potrebno za njihovo preživetje, rast in razmnoževanje. Pogoji morajo biti čim bolj podobni tistim v organizmu, zato ima gojišče ustrezno vrednost pH (7,4) ter ustrezno temperaturo. Celice sesalcev gojimo v inkubatorju pri 37 °C in atmosferi s 5 % CO₂. Rastne faktorje celicam zagotovimo z dodajanjem seruma telečjih zarodkov (angl. *Fetal Bovine Serum*; FBS) v gojišče. Plastenke, v katerih gojimo celične linije, morajo biti sterilne, omogočati morajo pritrjevanje celic na podlago. Vsa laboratorijska oprema mora biti sterilna, da ne pride do kontaminacije. Pomembno je, da celice pri gojenju v pogojih *in vitro* ohranijo lastnosti tkiva, iz katerega izvirajo.

3.2.1 Humane mezenhimske matične celice

V poskusih smo uporabljali celice pasaž od 2–10. Zaporedna številka pasaže pomeni, kolikokrat smo celice presadili (pasirali) v novo plastenko. V preglednici 4 so navedeni podatki o izvoru in opravljenih testih mezenhimskih celičnih linij, ki smo jih uporabljali v poskušu.

Preglednica 4: Izvor mezenhimskih celičnih linij

OZNAKA	KATALOŠKA ŠT.	DONOR	OPRAVLJENI TESTI
MMC1	Lonza 7F3458	moški, 36 let	testirani na viruse (HIV, HBV, HCV), mikoplazme, bakterije, kvasovke, glice; 90 % pozitivni na površinske antigene: CD105, CD166, CD29, CD44; negativni na hematopoetske markerje: CD14, CD34, CD45
MMC2	Lonza 6F4393	moški, 19 let	testirani na viruse (HIV, HBV, HCV), mikoplazme, bakterije, kvasovke, glice; 90 % pozitivni na površinske antigene: CD105, CD166, CD29, CD44; negativni na hematopoetske markerje: CD14, CD34, CD45

3.2.2 Celične linije GBM

V preglednici 5 je naveden izvor in značilnosti celičnih linij GBM, ki smo jih v poskusu uporabljali.

Preglednica 5: Izvor celičnih linij GBM

OZNAKA	DONOR	ZNAČILNOSTI
U87	ATCC ženska, 44 let (bela rasa)	<ul style="list-style-type: none"> maligne celice iz multiformnega glioblastoma morfološko so epitelne celice, imajo zvezdasto obliko, rastejo pritrjene na podlago linija je po številu kromosomov haploidna
U373	ATCC moški, 61 let (bela rasa)	<ul style="list-style-type: none"> maligne celice iz tumorja glioblastoma-astrocitoma morfološko so epitelne celice rastejo v monosloju, pritrjene na podlago tumorigene
U251	ATCC, humane celice	<ul style="list-style-type: none"> maligne celice iz multiformnega glioblastoma morfološko epitelne celice, zvezdasta oblika rastejo v monosloju, pritrjene na podlago linija je po številu kromosomov hipotriploidna

ATCC – angl.: *American type culture collection*

3.3 PRIPRAVA RAZTOPIN IN GOJIŠČ

3.3.1 Priprava raztopin

Vse raztopine, ki smo jih uporabljali pri delu, smo sterilno pripravili in jih hranili pri pogojih, ki jih je zahtevala določena raztopina.

3.3.2 Priprava gojišč za gojenje celičnih kultur in vitro

Gojišča smo pripravljali v sterilne 250 ml plastenke. Najprej smo odpipetirali FBS, ki smo mu dodali ostale dodatke. Ustrezno količino gojišča DMEM smo odpipetirali v plastenko in nato vanjo filtrirali (velikost por 0,20 µm) pripravljen FBS. S filtracijo smo odstranili drobir, ki bi bil lahko citotoksičen za celice. Gojišča smo shranjevali v hladilniku pri 4 °C. Vsakih 14 dni smo gojišča pripravljali v sveže plastenke, če PS in L-glutamina nismo porabili sproti, smo po 14 dnevih vzeli svežega. Pred uporabo smo gojišča v vodni kopeli ogreli na 37 °C. Sestava gojišč je prikazana v preglednicah 6, 7 in 8.

Preglednica 6: Sestava gojišča za gojenje MMC

Sestavine	Količina za 100 ml
DMEM (Sigma D5921)	76 ml
FBS	20 ml
L – glutamin (2 mM)	1 ml
Penicilin streptomycin (100x raztopina)	1 ml
Neesencialne aminokisline (10 mM)	1 ml
Natrijev piruvat (100 mM)	1 ml

Preglednica 7: Sestava gojišča za gojenje U87, U373 in U251

Sestavine	Količina za 100 ml
DMEM (Sigma D5921)	86 ml
FBS	10 ml
L – glutamin (2 mM)	1 ml
Penicilin streptomycin (100x raztopina)	1 ml
Neesencialne aminokisline (10 mM)	1 ml
Natrijev piruvat (100 mM)	1 ml

Preglednica 8: Sestava eksperimentalnega gojišča

Sestavine	Količina za 100 ml
MEM	88 ml
FBS	10 ml
L – glutamin (2 mM)	1 ml
Penicilin streptomycin (100x raztopina)	1 ml

Kondicionirano gojišče smo pripravili tako, da smo normalno rastocim celicam pri 70 % konfluenci odpipetirali staro gojišče in dodali eksperimentalno gojišče ter jih inkubirali 24 ur. Tega smo nato odpipetirali v centrifugirko in centrifugirali pri 1000 vrt./min 5 min. Supernatant smo do uporabe zamrznili v označenih kriovialah pri -80 °C. Pred uporabo v poskusu smo ga redčili z eksperimentalnim gojiščem v razmerju 1 : 1.

3.3.3 Priprava krovnih stekelc, prevlečenih s poli-L-lizinom

Stekelca smo pripravljali s sterilno opremo v brezprašni komori.

- v sterilno petrijevko premera 12 mm smo prenesli 30–40 steriliziranih krovnih stekelc,
- dodali smo 15 ml raztopine poli-L-Lizina ($c = 20 \mu\text{g/ml}$),
- petrijevko s potopljenimi stekelci smo ovili s parafilmom in jo na stresalniku stresali dve uri,
- po dveh urah smo stekelca 3-krat po 30 minut spirali z destilirano vodo (10–15 ml),
- postavili smo jih pokončno ob rob sveže petrijevke in jih čez noč sušili v brezprašni komori,
- posušena stekelca smo spravili v sterilno označeno petrijevko in shranili za nadaljnje poskuse.

Za stekelca, prevlečena s poli-L-lizinom, je značilno, da omogočajo pritrjevanje celic. Celice so tako primerne za imunohistokemična barvanja, pri katerih so močno podvržene spiranju. Tehniko gojenja celic na takih stekelcih smo uporabili pri imunohistokemičnem barvanju s protitelesom Ki-67.

3.4 METODE DELA

3.4.1 Gojenje celičnih linij *in vitro*

3.4.1.1 Gojenje mezenhimskih matičnih celic

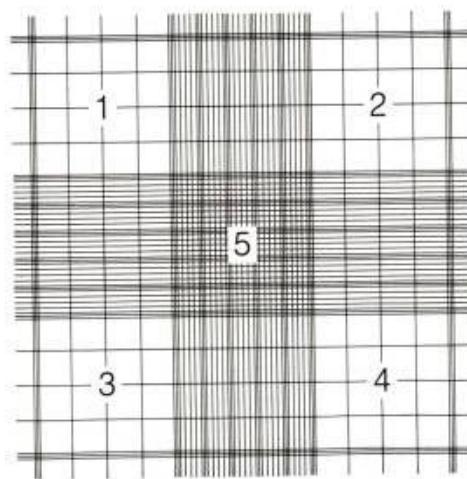
Vse postopke s celičnimi linijami smo izvajali s sterilno opremo v brezprašni celični komori. Uporabljali smo gojišča z 20 % vsebnostjo seruma (Preglednica 6). Celične kulture smo gojili v sterilnih plasenkah za celične kulture in jih inkubirali v inkubatorju pri 37 °C in 5 % atmosferi CO₂, kar ustreza pogojem v človeškem telesu. Trikrat tedensko smo jim zamenjali gojišče. Uporabljali smo plasenke velikosti 25 in 75 cm². Z invertnim mikroskopom smo preverjali konfluenco, obliko ter obnašanje celic v pogojih *in vitro*. Pri 70 % konfluenci, to je pri 70 % pokritosti dna plasenke, smo jih presadili s postopkom tripsinizacije. Tripsin je proteolitični encim, ki razgrajuje medcelične povezave.

Postopek presajanja celic:

- kulti enoslojnih celic smo odstranili gojišče,
- celice smo sprali z 1 x PBS, da smo odstranili ostanek gojišča, ki bi lahko zaviralo delovanje tripsina,
- dodali smo tripsin (1 ml/25 cm² plasenka) ter pustili 2–5 minut, da so se povezave med celicami razgradile, kar smo preverjali pod mikroskopom,
- dodali smo sveže gojišče, ki je ustavilo delovanje tripsina,
- enocelično suspenzijo smo z 10 ml pipeto prenesli v sterilno 15 ml centrifugirko,
- centrifugirali smo 5 minut pri 1000 vrt./min,
- odpipetirali smo gojišče skoraj do peleta, pretresli centrifugirko, da se je pelet razbil in resuspendirali v določeni količini gojišča, ki smo ga izbrali glede na število celic v suspenziji in želeno število celic v sveži plasenki,
- določeno količino (Preglednica 9) smo prenesli v svežo plasenkovo in dodali sveže gojišče.

Najmanjša količina gojišča v 25 cm² plasenki je 5 ml, v 75 cm² pa 12 ml.

3.4.1.2 Štetje celic



Slika 7: Mreža hemocitometra za štetje celic (Qwikstep, 2011)

Na hemocitometru (Slika 7) preštejemo celice na štirih kvadratih površine 1 mm^2 in število celic izračunamo po formuli:

$$N = ((1 + 2 + 3 + 4)/4) * R * K_p ,$$

N – število celic

1, 2, 3, 4 – število celic v posameznem kvadratu

R – faktor redčenja; količina suspenzije, iz katere smo vzeli vzorec za štetje (npr. 10 ml)

K_p – faktor za izračun števila celic v 1 ml suspenziji; globina komore hemocitometra je 0,1 mm, površina vsakega kvadratka je 1 mm^2 , torej je volumen suspenzije $0,1 \mu\text{l}$ in $K_p = 10^4$.

3.4.1.3 Gojenje celičnih linij GBM

Celične linije U373, U251 in U87 smo gojili v gojišču z 10 % FBS (Preglednica 7). V 3–4 dneh so dosegle 70 % konfluenco, nato smo jih s postopkom tripsinizacije presadili v nove gojitvene plastenke. Presajanje poteka po istem postopku kot za MMC, gostota nasaditve celic je navedena v Preglednici 9.

Preglednica 9: Priporočena gostota celic za nasaditev T25

Vrsta celic	Gostota celic	T25
MMC	5000–6000 celic/cm ²	1,3–1,5 x 10 ⁵ celic
U373, U251	15.000 celic/cm ²	3,8–4,5 x 10 ⁵ celic
U87	15.000 celic/cm ²	3,8–4,5 x 10 ⁵ celic

3.4.2 Shema poskusov

Za vse poskuse smo uporabljali t.i. eksperimentalno gojišče (Preglednica 8). Celice smo po odmrznitvi najprej pustili, da so se prilagodile na pogoje gojenja, jih enkrat presadili, nato pa uporabili v poskusih. Vse celice za poskuse so bile pred uporabo v poskusu vsaj 70 % konfluentne. Za vsak poskus smo naredili tri ponovitve. Podatke smo uvozili v program Excel (Microsoft Office), kjer smo jih statistično obdelali in pri tem uporabili Studentov t-test z dvodelno porazdelitvijo in dvovzorčno neenako varianco. Za statistično značilnost smo uporabili mejo tveganja 0,05 ($p < 0,05$), kar pomeni, da lahko z več kot 95 % verjetnostjo trdimo, da se povprečji dveh vzorcev statistično značilno razlikujeta.

3.4.2.1 Izvedba poskusa za serumsko odvisnost

S poskusom smo želeli preveriti, kako se MMC in celične linije GBM odzivajo na različno količino seruma v gojišču ter kakšna je razlika v odvisnosti od količine seruma med njimi. Poskus smo izvedli v treh ponovitvah. Za ugotavljanje števila živih celic smo uporabili MTT-test.

Nastavitev poskusa

- V plošče BD (plošče za gojenje celic s 24 vdolbinami) smo odpipetirali suspenzijo posameznih celic vsake celične linije: MMC, U373, U251 in U87.
- Za vsako linijo smo nasadili 12 vdolbin z gostoto celic: MMC 10.000 celic/ml gojišča/vdolbino, GBM pa 36.000 celic/ml gojišča/vdolbino.
- Plošče smo dali čez noč v inkubator in naslednji dan odpipetirali staro gojišče, vdolbine smo sprali z 1 x PBS.
- Dodali smo pripravljena gojišča z različno koncentracijo seruma (0, 1, 10, 20 %) (Preglednica 10).
- Po treh dneh (72 urah) inkubacije smo dodali MTT (100 µl/1 ml gojišča) in pustili v inkubatorju 3 ure.
- V digestoriju smo odpipetirali gojišče, dvakrat sprali z 1 x PBS in dodali 250 µl DMSO, da so se kristalčki formazana raztopili.

- Na mikrotitrsko ploščo (s 96 vdolbinami) smo od vsake prejšnje vdolbine odpipetirali po 100 µl v dve vdolbini na mikrotitrski plošči in na spektrofluorimetru kolorimetrično izmerili absorbanco pri valovni dolžini 570 nm in referenčni valovni dolžini 690 nm ($A_{570/690}$).

Preglednica 10: Priprava 30 ml gojišča z različnim odstotkom seruma

	0 % seruma	1 % seruma	10 % seruma	20 % seruma
FBS	/	300 µl	3 ml	6 ml
Penicilin strept.	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
L-glutamin	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
DMEM	30 ml	29,7 ml	27 ml	24 ml
Skupaj	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml

3.4.2.2 Proliferacijski test s Ki-67

Poskus je bil sestavljen iz dveh delov. V prvem smo celice gojili v kondicioniranem gojišču (MMC in GBM v U87 CM in obratno), v drugem delu pa smo celice gojili v indirektnih ko-kulturah (MMC in GBM s celicami U87 in obratno) (Slika 8). Za gojenje celic v ko-kulturah smo uporabili filtrske vstavke (pore 0,4 µm) za plošče s 24 vdolbinami (BD Falcon).

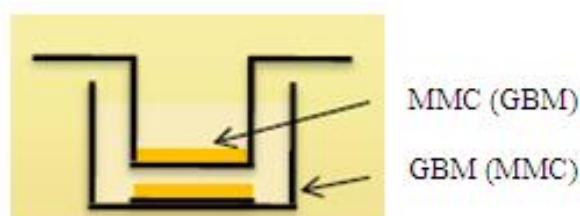
Postopek

- Celice smo nasadili v vdolbine BD plošče, v katerih so bila stekelca, ki smo jih predhodno prevlekli s poli-L-lizinom (glej pripravo stekelc).
- Nasadili smo 5000 celic/stekelce.
- Plošče smo dali v inkubator in pustili 3 ure, da so se celice pritrdile na stekelca.
- Dodali smo še 800 µl svežega eksperimentalnega gojišča v vdolbine za kontrolo, ter kondicionirano gojišče (od MMC in GBM na celice U87 in obratno), skupaj 850 µl/vdolbino.
- Kondicionirano gojišče smo redčili z eksperimentalnim 1 : 1, da je dovolj hranilnih snovi za normalno rast celic.
- Inkubirali smo tri dni (72 ur).
- Pri poskusih s filtrskimi vstavki smo po 3 urah inkubacije v vdolbine odpipetirali 750 µl eksperimentalnega gojišča/vdolbino, na vrh smo nastavili filtrski vstavek, v katerega smo pred tem nasadili 5000 celic/50 µl/vstavek. V vstavek smo dodali še 150 µl eksperimentalnega gojišča, skupno 950 µl/vdolbino.

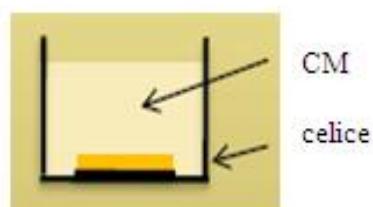
INDIREKTNE KO-KULTURE



- Filtrske vstavki (pore 0,4 µm)



- Uporaba kondicioniranega gojišča (CM)



Slika 8: Indirektne ko-kulture: uporaba filtrskih vstavkov (Boyden chambre) in uporaba kondicioniranega gojišča (CM)

Barvanje celic na antigen Ki-67

Barvanje je potekalo nesterilno v temni sobi. Po fiksaciji smo odpipetirali metanol in pustili, da so se plošče posušile ter jih shranili pri 4 °C do uporabe. Ko smo začeli z barvanjem, smo jih rehidrirali z 1 x PBS, 15 min pri sobni temperaturi. Med vsakim korakom smo stekelca sprali v 1 x PBS, ki smo ga imeli pripravljenega v čaši.

Postopek

- Odstranili smo gojišče, dodali nesterilen 1 x PBS, s katerim smo dvakrat sprali vse vdolbine.
- Za fiksacijo celic na stekelca smo uporabili mrzli (-20°C) metanol (0,5 ml/vdolbino) in pustili 15 min na sobni temperaturi.
- Metanol smo odstranili in celice sprali z 1 x PBS.
- Stekelca smo s pinceto položili na pripravljene podložke.
- Med vsakim naslednjim korakom smo stekelca spirali z 1 x PBS.
- Na stekelca smo s pipeto kanili $100 \mu\text{l}$ 0,1 % tritona in pustili 10 min. Triton je sprožil postopek permeabilizacije. V celični membrani je naredil pore, da so protitelesa lahko prehajala skozi.
- Dodali smo $100 \mu\text{l}$ 4 % BSA (10–15 min), ki je preprečil nespecifične vezave protiteles.
- Dodali smo $100 \mu\text{l}$ primarnega monoklonskega protitelesa, ki smo ga redčili 1 : 200 (v 1 x PBS) in pustili na sobni temperaturi 1 uro.
- Od tukaj naprej smo vse delali v zatemnjenem prostoru.
- Na stekelca smo odpipetirali $100 \mu\text{l}$ sekundarnega protitelesa (AF 488), ki smo ga redčili 1 : 500 (v 1 x PBS), ter pustili 1 uro.
- Nato smo odpipetirali $100 \mu\text{l}$ barvila Hoechst, ki smo ga redčili 1 : 1000 (v 1 x PBS) in pustili delovati 5 min. To barvilo je obarvalo vsa jedra, kar nam je pomagalo pri štetju skupnega števila celic.
- Na označena objektna stekelca smo kanili kapljico vklopnega medija, ki ohranja fluorescenco. Stekelca smo sprali v 1 x PBS in jih položili na kapljico s celicami, obrnjenimi navzdol na objektna stekelca.
- Tako pripravljene preparate smo do analize shranili pri -20°C .
- Preparate smo gledali pod fluorescenčnim mikroskopom. Najprej smo prešteli skupno število celic pod DAPI, nato pa še obarvane s Ki-67 pod zelenim filtrom oznake G2. Šteli smo celice, pozitivne na Ki-67, katerih jedra so se močno svetila in imela dobro viden rob.

3.4.2.3 Priprava poskusa za test kromosomske nestabilnosti

Mikronukleus (MN) ali mikrojedro (MJ) je del kromosoma ali cel kromosom, ki se po celični delitvi ni pravilno razporedil v jedro hčerinske celice. Povečanje števila mikrojeder je pokazatelj povečanja preloma kromosomov in nepravilnosti pri celični delitvi.

Priprava celic

- Celice smo nasadili v BD plošče, v katerih so bila stekelca, ki smo jih predhodno prevlekli s poli-L-lizinom.
- Nasadili smo jih z gostoto 5000 celic/50 µl/vdolbino.
- Plošče smo položili v inkubator za 3 ure, da so se prirstile na stekelca.
- Dodali smo še 800 µl svežega eksperimentalnega gojišča v vdolbine za kontrolo, ter kondicionirano gojišče (od U87 na MMC in GBM in obratno), skupaj 850 µl/vdolbino.
- Kondicionirano gojišče smo redčili z eksperimentalnim 1 : 1, da je bilo dovolj hranilnih snovi za normalno rast celic.
- Inkubirali smo tri dni (72 ur) in s tem zagotovili, da so se celice najmanj enkrat delile.
- Po izteku inkubacije smo celice dvakrat sprali z 1 x PBS in jih 5 min inkubirali v hipotoničnem pufru na 37 °C, da je citoplazma celic nabreknila.
- Celice smo 2 x 2 minuti fiksirali z ledeno mrzlo mešanico absolutnega metanola in 6 % ocetne kisline.
- Fiksativ smo nato odpipetirali in stekelca posušili.
- Plošče smo do analize hranili na 4 °C.

Barvanje stekelc in štetje MJ

Celice smo barvali z akridin oranžnim barvilom in jih opazovali ter šteli pod fluorescenčnim mikroskopom z zelenim filtrom z oznako G2. Barvilo akridin oranž pripravimo z redčenjem založne raztopine s koncentracijo 10 µg/ml, da dobimo delovno raztopino s koncentracijo 3 µg/ml. Redčimo z 1 x PBS. Kapljico barvila smo kanili na objektno steklo in nanjo položili krovno stekelce. Predhodno smo jih 15 min rehidrirali v 1 x PBS. Prešteli smo vsaj 1000 celic na vzorec.

Kriteriji za določanje mikrojeder (Fenech, 2000):

- premer mikrojedra ni večji kot 1/3 premera glavnega jedra,
- mikrojedra niso povezana z glavnim jedrom,
- mikrojedra so povezana enako ali bolj intenzivno kot glavna jedra.

Na vsakem vidnem polju smo beležili MJ, apoptotične celice in skupno število celic. Podatke smo vpisovali v tabelo programa Excel in za statistično analizo podatkov uporabili Student-ov test ali t-test. Apoptotski indeks (AI) smo izračunali na naslednji način:

$$AI = \frac{\text{število apoptotičnih celic}}{\text{število vseh celic}} \dots \dots \dots (1)$$

$$MJ = \frac{\text{število MJ}}{\text{število vseh celic}}$$

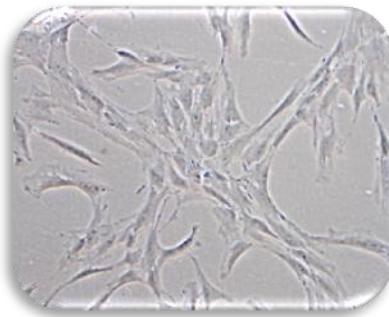
V poskusu nismo uporabili testa CBMN (angl. *cytokinesis-block micronucleus assay*), kjer s citohalazinom B blokiramo citokinezo (delitev citoplazme na dve celici) z razkrojem kontraktilnega obroča. Mikrojedra se izrazijo samo takrat, ko je končana celična delitev, zato so razvili metodo, ki zaustavi celice po končani delitvi jedra (Fenech, 2000 in 2006).

4 REZULTATI

4.1 CELIČNE LINIJE

4.1.1 Mezenhimske matične celice (MMC1, MMC2)

V poskusih smo uporabljali dva klena humanih mezenhimskih matičnih celic, ki smo jih gojili po priporočilih prodajalca (Lonza) (Slika 9, 10). Klon MMC1 raste počasneje od klona MMC2 (Motaln in sod., 2010). Morfološko so MMC podobne fibroblastom. Nacepljali smo jih z gostoto 5.000–6.000 celic/cm². Pri tej gostoti nacepljanja so celice dosegle 70–80 % konfluenco v 6–8 dneh in nato smo jih presadili v novo plastenko. Gojili smo jih v gojišču z 20 % topotno inaktiviranega FBS.



Slika 9: Mezenhimske matične celice (klon MMC1), 100x povečava. Klon MMC1 spada med počasnejše rastoče klone, zato ima manjšo gostoto celic kot klon MMC2.

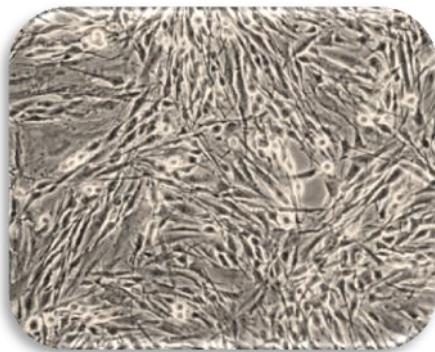


Slika 10: Mezenhimske matične celice (klon MMC2), 100x povečava. Klon MMC 2 je hitreje rastoči klon in ima ob istem času v primerjavi z MMC1 večjo gostoto celic.

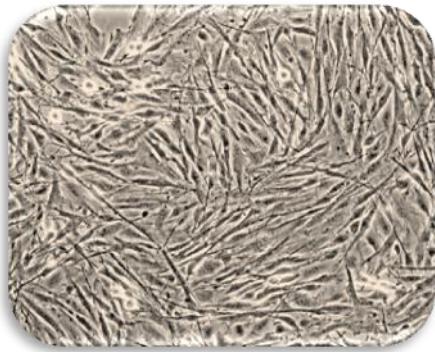
4.1.2 Glioblastomske celične linije (U87, U373, U251)

V raziskavi smo uporabljali rakave celične linije U373, U251 in U87 (Slika 11, Slika 12, Slika 13), izolirane iz multiformnega glioblastoma, ki smo jih dobili iz zbirke ATCC. Izvirajo iz istega tipa tumorja, vendar so med njimi razlike. Vse tri linije rastejo pritrjene na podlago in so po morfologiji podobne živčnim celicam. Morfološko sta si U373 in U251 bolj podobni, U87 pa tvori značilno mrežo in okrogle skupke z diferenciranimi celicami.

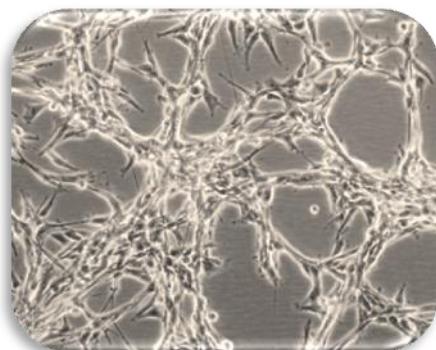
Celični liniji U373 in U251 smo nacepljali z gostoto $10.000 \text{ celic/cm}^2$ in jih gojili v gojišču z 10 % toplotno inaktiviranega FBS (glej poglavje 3.3.2). Celice so hitro rastoče in smo jih presajali pri 70–80 % konfluenci, ki so jo dosegle v 3–4 dneh. Celično linijo U87 smo nacepljali z gostoto $15.000 \text{ celic/cm}^2$ in jih gojili v gojišču z 10 % toplotno inaktiviranega FBS.



Slika 11: Celice U373, 100x povečava



Slika 12: Celice U251, 100x povečava

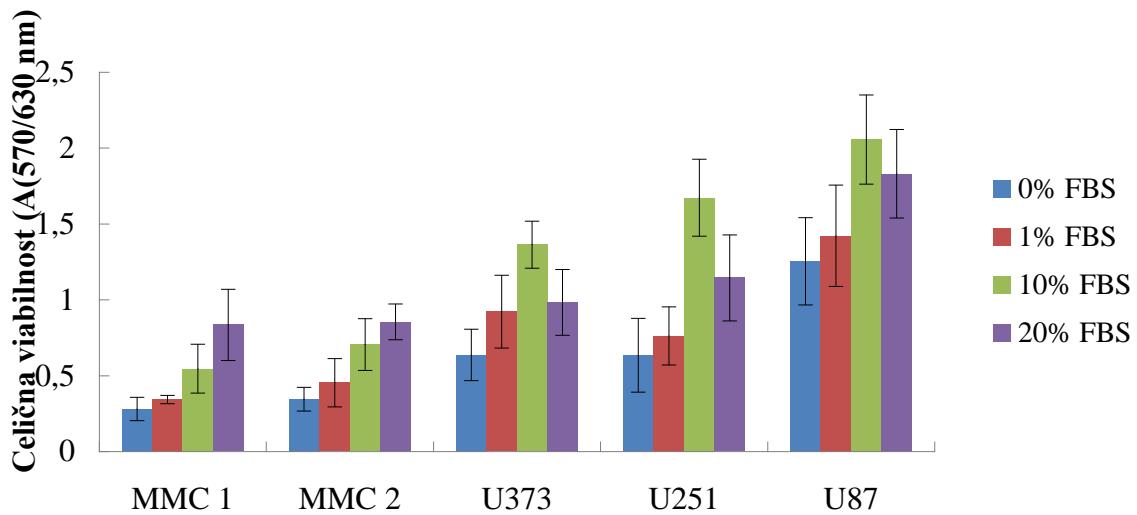


Slika 13: Celice U87, 100x povečava

4.2 REZULTATI POSKUSOV

4.2.1 Serumska odvisnost

Zanimala nas je proliferacija celic pri različni koncentraciji seruma (FBS) v gojišču. Poskus smo nastavili z dvema klonoma MMC ter tremi linijami celic GBM (U373, U251 in U87). Poskus smo trikrat ponovili. Testirali smo gojišča z 0, 1, 10 in 20 % seruma. Po 72 urah smo učinek preverili s testom MTT. Žive celice namreč s svojim encimom dehidrogenazo reducirajo MTT v kristale formazana. Tega potem raztopimo v DMSO in izmerimo absorbance je linearno odvisna od števila živih celic.



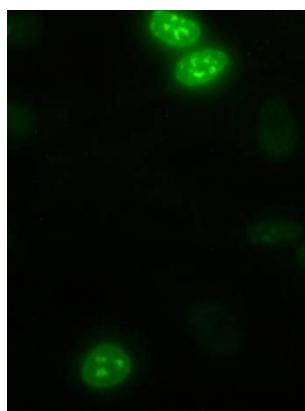
Slika 14: Odvisnost rasti celičnih linij od količine seruma v gojišču. V poskusu smo uporabili MMC (1 in 2) ter celice GBM (U373, U251 in U87), kjer smo ugotavljali njihov odziv na količino FBS-a v gojišču (0, 1, 10, 20 %). Poskus smo opravili v treh ponovitvah. Trend odziva MMC se razlikuje od celic GBM.

Sliko 14 lahko razdelimo v dve skupini, na levi strani je skupina MMC (MMC1 in MMC2) na desni pa skupina celic GBM (U373, U251 in U87). Pri obeh klonih MMC se rast linearno povečuje sorazmerno s količino seruma v gojišču, tako je njihova proliferacija najvišja pri 20 % seruma v gojišču. Pri klonu MMC1 je največji preskok iz 10 na 20 % seruma v gojišču, pri MMC2 pa iz 1 na 10 %. Klon MMC1 je v vseh štirih gojiščih rasel rahlo počasneje kot MMC2, kar potrjuje, da je MMC1 počasi rastoči klon.

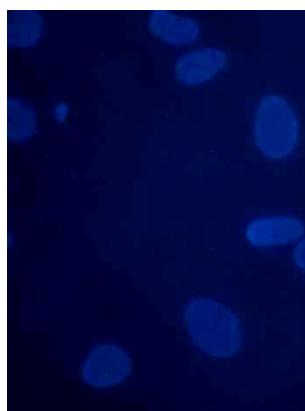
Celicam GBM najbolj ustreza gojišče z 10 % seruma, pri 20 % pa se njihova rast že zmanjšuje. Celice GBM kažejo višjo stopnjo proliferacije (stolpci so višji), saj rastejo hitreje kot MMC. Pri celicah U87 (GBM) pa je ta razlika še večja. U87 najbolje rastejo v 10 % gojišču in se jim pri 20 % proliferacija zmanjša. Pri celicah GBM je najvišji preskok viden iz 1 na 10 % seruma v gojišču. Najbolj se izrazi pri U251, kjer se je količina celic kar podvojila, potem pri U87, najmanj pa je preskok viden pri U373. Če med sabo primerjamo obe skupini (MMC in GBM) opazimo, da so pri GBM stolpci precej višji kot pri MMC. Glavna razlika je, da MMC najbolje proliferirajo pri 20 % seruma v gojišču, GBM pa pri 10 %.

4.2.2 Barvanje na antigen Ki-67

Za ugotavljanje vpliva kondicioniranega gojišča ter celic v ko-kulturah na rast in proliferacijo MMC in celic GBM smo uporabili metodo označevanja celic s protitelesom proti proteinu Ki-67 ter barvilo Hoechst. Poskus je bil sestavljen iz dveh delov. V prvem delu smo celice gojili v kondicioniranem gojišču (MMC in GBM v U87 CM in obratno), v drugem delu pa smo celice gojili v indirektnih ko-kulturah (MMC in GBM s celicami U87 in obratno). Za poskus s kondicioniranim gojiščem smo celice z gostoto 5000 celic//50 µl/vdolbino nasadili na stekelca, prevlečena s poli-lizinom. Za gojenje celic v ko-kulturah smo uporabili filtrske vstavke (pore 0,4 µm) za plošče s 24 vdolbinami (BD plošče). Po treh dneh smo opravili barvanje s protitelesom Ki-67 in barvilo Hoechst. Izvedli smo po tri zaporedne neodvisne poskuse s ko-kulturami in po tri s kondicioniranim gojiščem. Rezultate smo prikazali kot razmerje med številom proliferajočih celic (Ki-67 +) in celotnim številom celic (barvilo Hoechst +) (Slika 15, Slika 16).



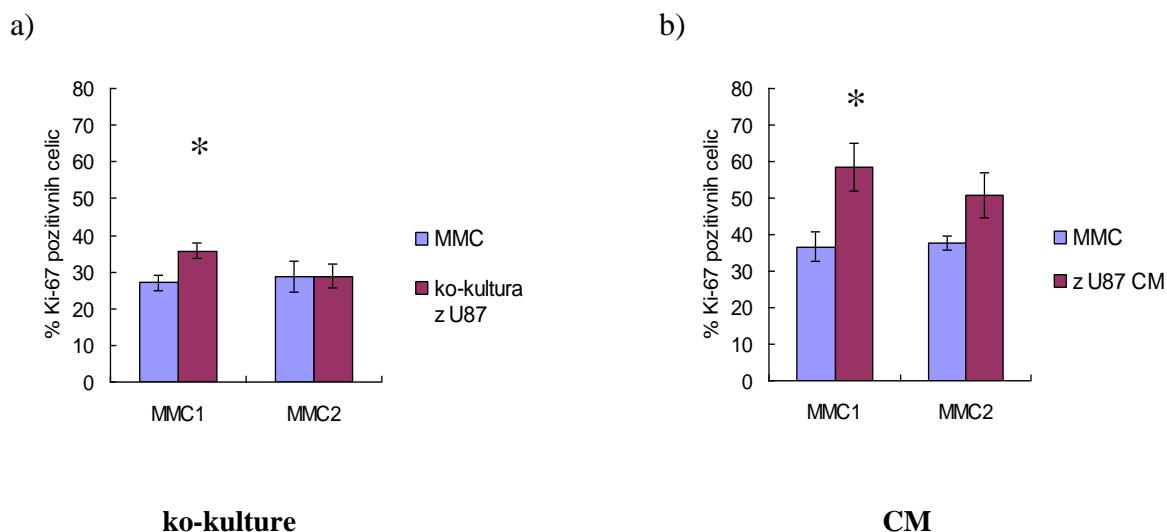
Slika 15: Celice obarvane z barvilm Hoechst, 100x povečava



Slika 16: Celice po barvanju s protitelesom Ki-67, 100x povečava

4.2.2.1 Določanje vpliva celic U87 na rast in proliferacijo MMC

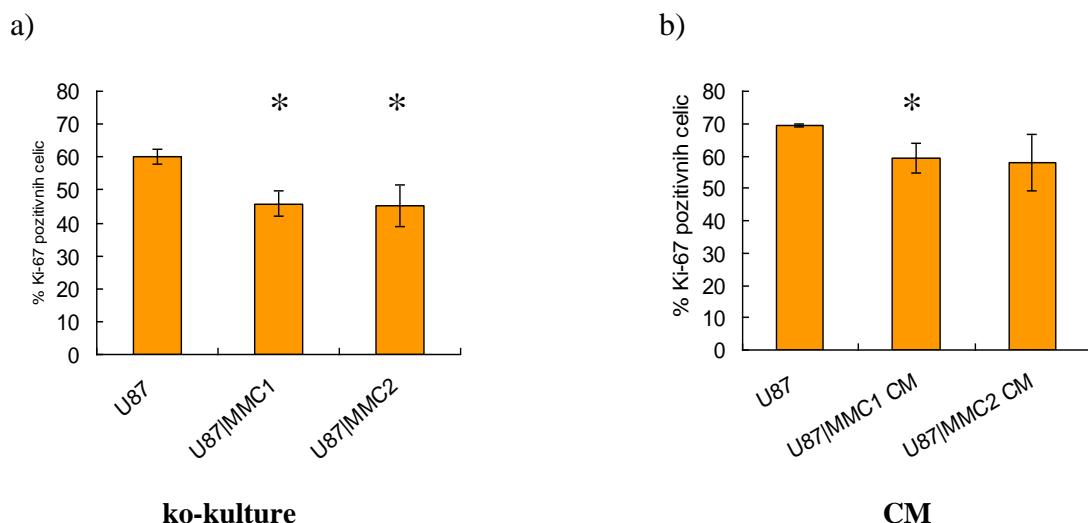
Iz slike 17 je razvidno, da MMC pod vplivom snovi, ki jih izločajo celice U87, povečajo svojo proliferacijo. Klon MMC1 je v obeh primerih statistično značilno povečal svojo proliferacijo. Proliferacija MMC1 se v ko-kulturah poveča za 28 %, v poskusu s CM celic U87 pa za 55 %. Klon MMC2 v ko-kulturi s celicami U87 ne kaže odstopanj od kontrole, v poskusu s CM celic U87 pa kaže za 31 % povišano proliferacijo glede na kontrolo, vendar učinek ni statistično značilen. V poskusu, kjer so MMC rasle v kondicioniranem gojišču celic U87, je razviden večji učinek na MMC. Pri obeh kontrolah rasti, kjer so celice rasle samo v eksperimentalnem gojišču, je opaziti, da klon MMC1 raste rahlo počasneje od klena MMC2, vendar razlika ni statistično značilna.



Slika 17: Vpliv celic U87 na proliferacijo MMC. Prikaz vpliva ko-kultur (a) in kondicioniranega gojišča (b) GBM na rast in proliferacijo klonov MMC1 in MMC2. MMC so bile 72 ur izpostavljene vplivu celic GBM ali njihovemu CM. Vpliv smo določili z metodo barvanja na antigen Ki-67. Poskus je bil ponovljen trikrat za obo dela (ko-kulture in CM). CM je bil razredčen z eksperimentalnim gojiščem 1 : 1. Vpliv je statistično značilen, če je $p < 0.05$ (*).

4.2.2.2 Določanje vpliva MMC na rast in proliferacijo celic U87

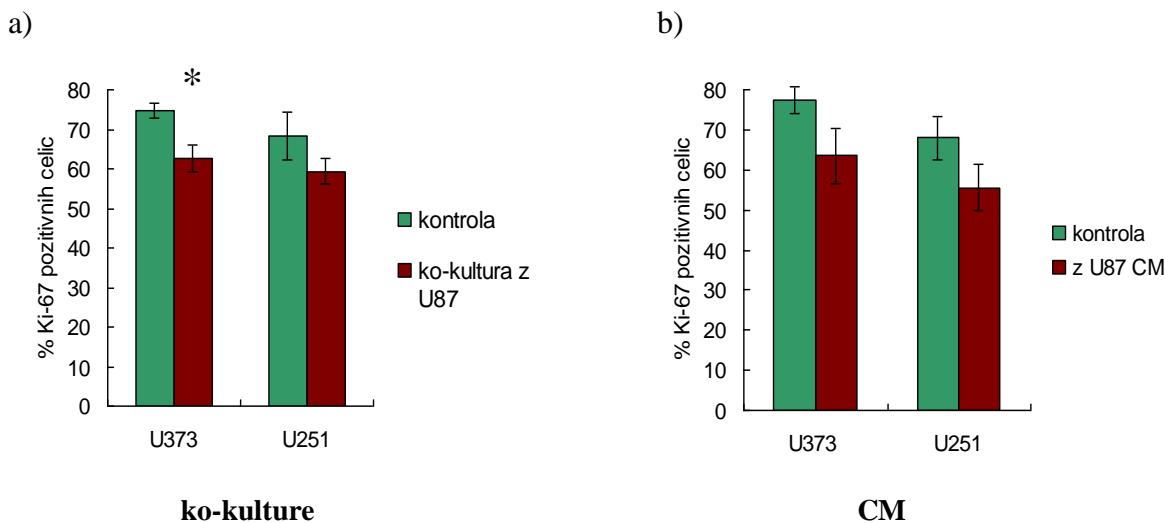
Slika 18 prikazuje vpliv MMC na proliferacijo celic U87. Tako pri ko-kulturah, kot pri poskusu s CM je razvidno, da celice U87 pod vplivom snovi, ki jih izločajo MMC, zmanjšajo svojo proliferacijo. Pri ko-kulturah sta oba klena MMC statistično značilno vplivala na zmanjšanje proliferacije celic U87. V poskusu s CM pa smo statistično značilno razliko dobili samo pri celicah, rastočih v MMC1 CM, čeprav so enako razliko pokazale tudi pri MMC2. Pri ko-kulturah sta oba klena MMC zmanjšala rast celic U87 za 23 % glede na kontrolo. Pri poskusu s CM pa se je rast zmanjšala za 14 %.



Slika 18: Vpliv MMC na proliferacijo celic U87. Prikaz vpliva ko-kultur (a) in kondicioniranega gojišča (b) MMC na rast in proliferacijo celic U87. Celice U87 so bile poskusnim pogojem izpostavljenje 72 ur. Vpliv smo določili z metodo barvanja na antigen Ki-67. Poskus je bil ponovljen trikrat za oba dela (ko-kulture in CM). Vpliv je statistično značilen, če je $p < 0.05$ (*).

4.2.2.3 Določanje vpliva celic U87 na rast in proliferacijo celic U373 in U251

Slika 10 prikazuje proliferacijo celic U373 in U251 pod vplivom celic U87 v ko-kulturah in v njihovem CM. Trend je na obeh straneh isti, celice U87 in njihov CM zaviralno delujejo na rast celic U373 in U251, vendar smo statistično značilno razliko dobili samo pri zmanjšanju proliferacije celic U373, rastočih v ko-kulturi s celicami U87. V ko-kulturah se je celicam U373 zmanjšala proliferacija za 16 %, U251 za 14 %, v poskusu s CM pa se je proliferacija celic U373 in U251 zmanjšala za 19 % glede na kontrolo. Iz kontrole, kjer so celice v obeh primerih rasle samo v eksperimentalnem gojišču, je razvidno, da je celična linija U373 rasla hitreje kot celična linija U251.

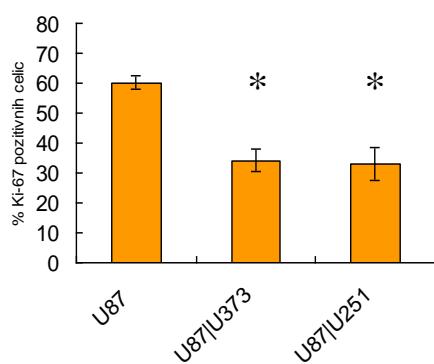


Slika 19: Vpliv celic U87 na proliferacijo celic U373 in U251. Prikaz vpliva ko-kultur (a) in kondicioniranega gojišča (b) U87 na rast celic U373 in U251. Celice U373 in U251 so bile poskusnim pogojem izpostavljene 72 ur. Vpliv smo določili z metodo barvanja na antigen Ki-67. Poskus je bil ponovljen trikrat (ko-kultura in CM). Vpliv je statistično značilen, če je $p < 0.05$ (*).

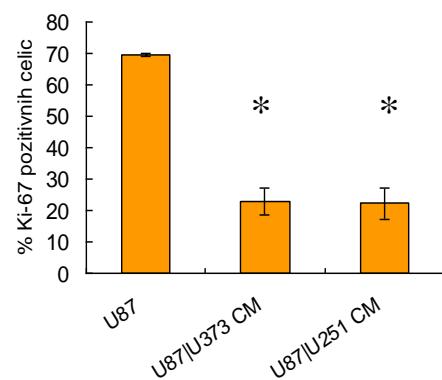
4.2.2.4 Določanje vpliva celic U373 in U251 na rast in proliferacijo celic U87

Slika 20 prikazuje vpliv celic U373 in U251 na proliferacijo celic U87. Trend je enak pri ko-kulturah in CM, celice U373 in U251 zaviralo delujejo na rast celic U87. Pri vseh je to statistično značilno. Tako pri ko-kulturah kot pri poskusu s CM je trend zaviranja proliferacije celic U87 enak. Pri ko-kulturah so celice U87 za 42 % zmanjšale svojo rast, v poskusu s CM pa za 69 %.

a)



b)

**ko-kulture****CM**

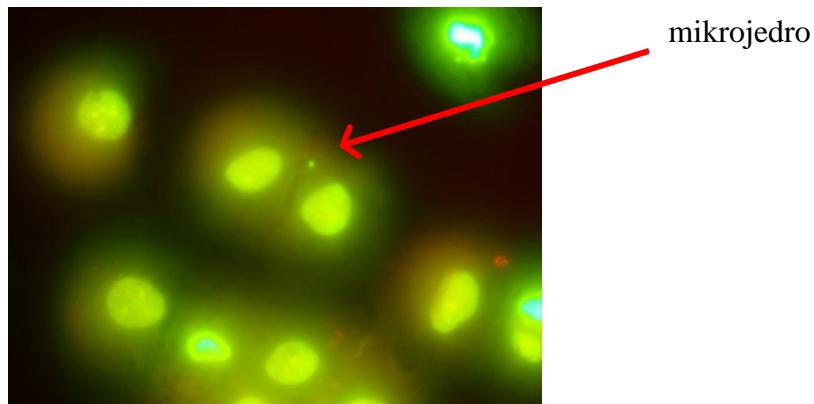
Slika 20: Vpliv celic U373 in U251 na proliferacijo celic U87. Prikaz vpliva ko-kultur (a) in kondicioniranega gojišča (b) U373 in U251 na rast in proliferacijo celic U87. Celice U87 so bile poskusnim pogojem izpostavljene 72 ur. Vpliv smo določili z metodo barvanja na antigen Ki-67. Poskus je bil ponovljen trikrat za oba dela (ko-kulture in CM). Vpliv je statistično značilen, če je $p < 0.05$ (*).

4.2.3 Kromosomska nestabilnost – test mikrojeder

Mikrojedro (MJ) je del kromosoma ali cel kromosom, ki se po celični delitvi ni pravilno razporedil v jedro hčerinske celice. Povečanje števila mikrojeder je pokazatelj povečanja preloma kromosomov in nepravilnosti pri celični delitvi. Ugotavliali smo vpliv kondicioniranega gojišča MMC na celice GBM in obratno. Celice smo nasadili na stekelca, prevlečena s poli-lizinom z gostoto 5000 celic/vdolbino. Kondicionirano gojišče smo redčili z eksperimentalnim v razmerju 1 : 1. Poskus smo naredili v treh ponovitvah. Celice so bile poskusnim pogojem izpostavljene 72 ur. Nato smo jih fiksirali in obarvali z akridin oranžnim barvilom za opazovanje in štetje pod mikroskopom. Pri štetju MJ smo uporabljali kriterije za določanje MJ po Fenechu (2000).

Kriteriji za določanje mikrojeder:

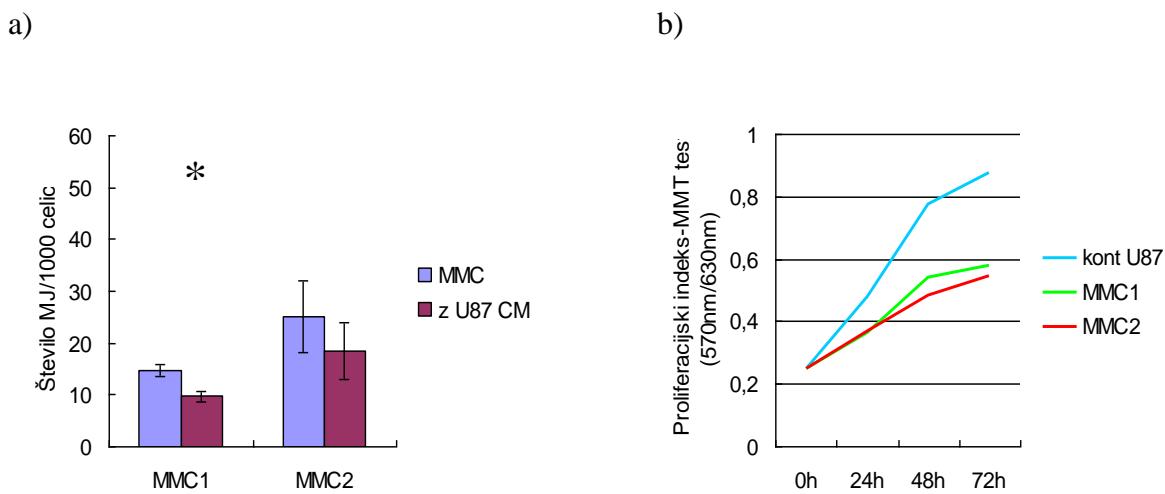
- premer mikrojedra ni večji kot 1/3 premera glavnega jedra,
- mikrojedra niso povezana z glavnim jedrom,
- mikrojedra so povezana enako ali bolj intenzivno kot glavna jedra.



Slika 21: Celici z mikrojedrom, 100x povečava

4.2.3.1 Določanje vpliva celic U87 na prisotnost mikrojeder pri MMC

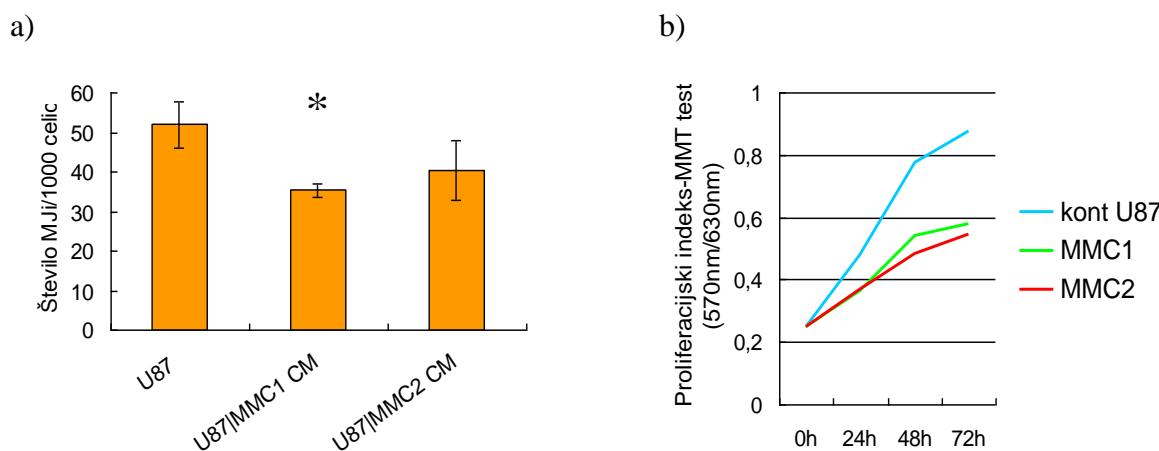
Slika 22 prikazuje vpliv celic U87 na prisotnost MJ pri MMC. Dodatek CM celic U87 pri obeh klonih MMC zmanjša prisotnost mikrojeder, pri MMC1 je to tudi statistično značilno. Povprečno število MJ v kontroli pri MMC1 je bilo 15/1000 celic. Z dodanim kondicioniranim gojiščem celic U87 pa se je število MJ znižalo za 33 %. Razlika je statistično značilna. Pri klonu MMC2 je število MJ v kontroli višje, 25 MJ/1000 celic in z dodatkom CM celic U87 pa se zniža za 24 %. Z MTT testom smo vzporedno preverjali proliferacijo celic in ugotovili, da kondicionirano gojišče ni delovalo toksično, saj so se celice med poskusom normalno delile.



Slika 22: Vpliv celic U87 na prisotnost mikrojeder pri MMC (a) in prikaz proliferacije celic med poskusom (b). MMC so bile 72 ur izpostavljene kondicioniranemu gojišču (redčenje 1 : 1 z eksperimentalnim gojiščem) celic U87. Celice smo nato fiksirali in jih obarvali z barvilom akridin oranž. Poskus smo ponovili trikrat. Proliferacijo smo preverjali z MTT testom. Vpliv je statistično značilen, če je $p < 0.05$ (*).

4.2.3.2 Določanje vpliva MMC na prisotnost mikrojeder pri celicah U87

Slika 23 prikazuje vpliv MMC na prisotnost MJ pri celicah U87. Vpliv klonov MMC je zmanjšal prisotnost MJ pri celicah U87. V kontroli celic U87 je bilo povprečno 52 MJ/1000 celic. Z dodatkom kondicioniranega gojišča MMC1 se je število MJ statistično značilno znižalo za 33 %. Z dodatkom CM MMC2 pa se je število znižalo za 23 %. Trend je bil pri dodatku CM MMC2 enak, vendar vpliv ni bil statistično značilen. Če primerjamo kontrole poskusov s testom MJ, vidimo, da imajo najmanj MJ v kontroli MMC1, sledijo MMC2, nato pa celice U87. Učinek CM celic U87 s podobno intenziteto deluje na prisotnost MJ pri MMC1, kot obratno kondicionirano gojišče MMC1 na U87.

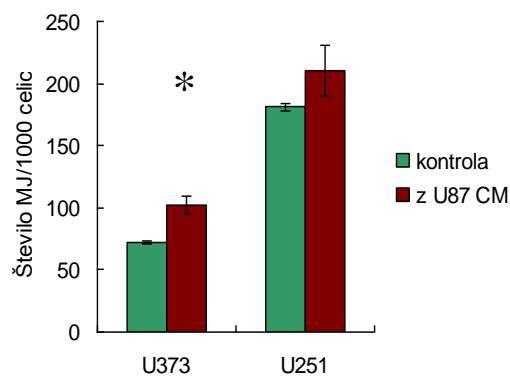


Slika 23: Vpliv MMC na prisotnost mikrojeder pri celicah U87 (a) in prikaz proliferacije celic med poskusom (b). Celice U87 so bile 72 ur izpostavljene kondicioniranemu gojišču MMC (redčenje 1 : 1 z eksperimentalnim gojiščem). Celice smo nato fiksirali in jih obarvali z barvilom akridin oranž. Proliferacijo smo preverjali z MTT testom. Vpliv je statistično značilen, če je $p < 0.05$ (*).

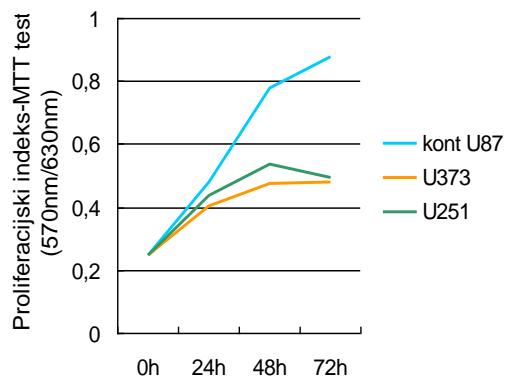
4.2.3.3 Določanje vpliva celic U87 na prisotnost mikrojeder pri celicah U373 in U251

Iz slike 24 je razvidno, da učinek CM celic U87 poveča prisotnost MJ pri celicah U373 in U251. Pri celicah U373 je število MJ v kontroli 75/1000 celic, vpliv kondicioniranega gojišča celic U87 pa število MJ poveča za 43 %. Povečanje MJ pri U373 je statistično značilno. Pri celicah U251 je bilo v kontroli 180 MJ/1000 celic, vpliv CM celic U87 pa je število zvišal za 17 %. Trend pri U251 je enak kot pri U373, vendar vpliv ni statistično značilen. Če primerjamo kontrole celic U373, U251 in MMC (Slika 22), je pri celicah U251 prisotnih veliko več MJ kot pri U373 in MMC.

a)



b)

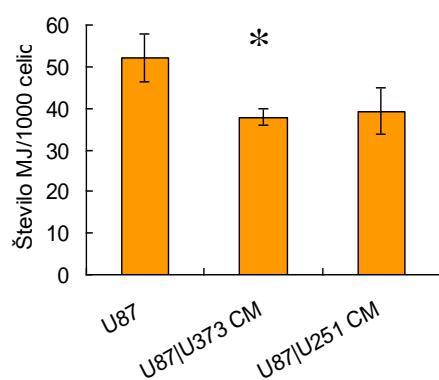


Slika 24: Vpliv celic U87 na prisotnost mikrojeder pri celicah U373 in U251 (a) in prikaz proliferacije celic med poskusom (b). Celice U373 in U251 so bile 72 ur izpostavljene kondicioniranemu gojišču (redčenje 1 : 1 z eksperimentalnim gojiščem) celic U87. Celice smo nato fiksirali in jihobarvali z barvilom akridin oranž. Proliferacijo smo preverjali s testom MTT (*).

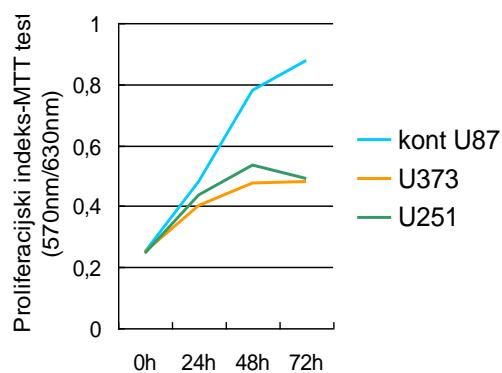
4.2.3.4 Določanje vpliva celic U373 in U251 na prisotnost mikrojeder pri celicah U87

Na sliki 25 lahko opazimo, da je bilo pri celicah U87 v kontroli povprečno 52 MJ/1000 celic, vpliv kondicioniranega gojišča celic U373 je statistično značilno zmanjšal število MJ za 25 %. Enak trend opazimo tudi pri vplivu CM celic U251, kjer se je prisotnost MJ pri celicah U87 zmanjšala za 23 %, vendar razlika ni bila statistično značilna. Če primerjamo kontroli celic U87 iz obeh poskusov s testom MJ, opazimo, da je prisotnost MJ pri obeh enaka.

a)



b)



Slika 25: Vpliv celic U373 in U251 na prisotnost mikrojeder pri celicah U87 (a) in prikaz proliferacije celic med poskusom (b). MMC so bile 72 ur izpostavljene kondicioniranemu gojišču (redčenje 1 : 1 z eksperimentalnim gojiščem) celic U87. Celice smo nato fiksirali in jih obarvali z barvilom akridin oranž. Proliferacijo smo preverjali z MTT testom. Vpliv je statistično značilen, če je $p < 0.05$ (*).

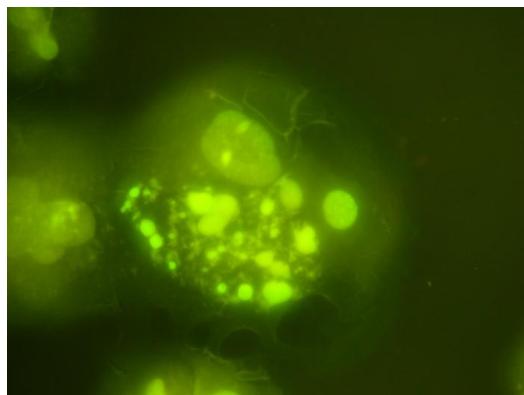
4.2.4 Apoptoza

Apoptoza je programirana celična smrt, ki je bistvena za normalen potek življenja. Če pride v DNA ali celici do poškodb, se aktivira postopek apoptoze, ki celico odstrani. Rakave celice so razvile sposobnosti izogibanja apoptotskim mehanizmom, zato se kljub poškodbam neomejeno delijo. Okvare na poti celične smrti so poglavitni vzroki za razvoj raka.

Ugotavljali smo prisotnost apoptoze v rakavih in mezenhimskih matičnih celicah. Preverjali smo vpliv kondicioniranega gojišča MMC na celice GBM in obratno, ter vpliv GBM celic med seboj. Celice smo nasadili na stekelca, prevlečena s poli-lizinom z gostoto 5000 celic/50 µl/vdolbino. Kondicionirano gojišče smo redčili z eksperimentalnim v razmerju 1 : 1. Poskus smo naredili v treh ponovitvah. Celice so bile poskusnim pogojem izpostavljene 72 ur. Nato smo jih fiksirali inobarvali z akridin oranžnim barvilom za opazovanje in štetje pod mikroskopom.

Kriterij za štetje apoptotičnih celic ter razločevanje med apoptotičnimi in nekrotičnimi celicami (Fenech, 2000):

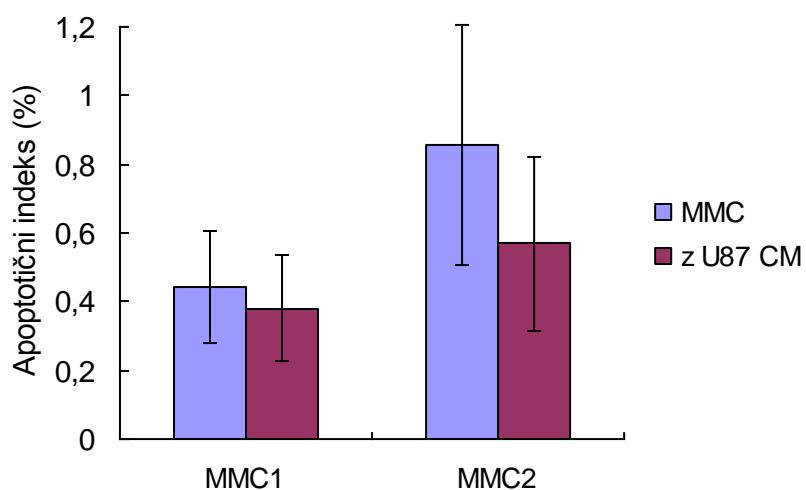
- apoptotične celice: imajo več jedrnih teles, v katerih je zgoščen kromatin, citoplazma je nepoškodovana, robovi jedra so ostri, vidni in nepoškodovani,
- nekrotične celice: imajo bledo citoplazmo z velikim številom vakuol, jedro je precej poškodovano, celica lahko skozi poškodovano membrano izgublja citoplazmo in ima delno uničene jadrne strukture.



Slika 26: Apoptoza celic v celični kulturi, 100x povečava

4.2.4.1 Določanje vpliva celic U87 na pogostost apoptoze pri MMC

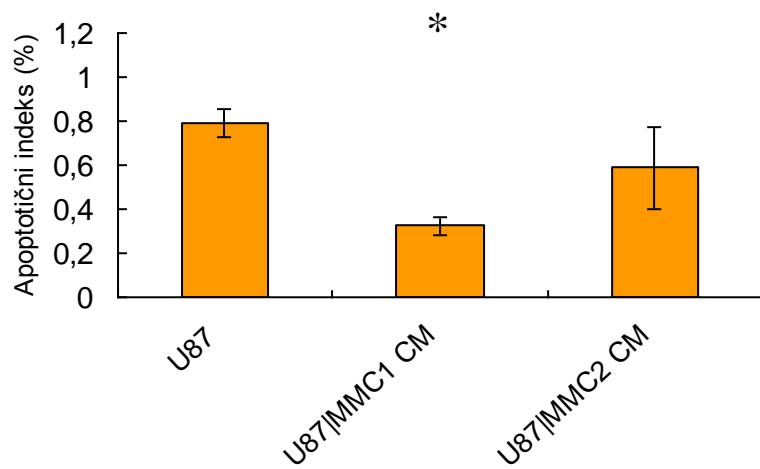
Iz slike 27 je razviden trend zmanjševanja prisotnosti apoptoze pri MMC pod vplivom kondicioniranega gojišča celic U87, vendar vpliv ni bil statistično značilen. V kontroli MMC1 najdemo manj apoptotičnih celic kot v kontroli MMC2. Apoptotični indeks MMC1 v kontroli je 0,44 %, pri MMC2 pa 0,86 %. Vpliv kondicioniranega gojišča celic U87 pri klonu MMC1 zmanjša apoptozo celic za 14 %, pri klonu MMC2 pa za 34 %.



Slika 27: Vpliv celic U87 na pogostost apoptoze pri MMC. MMC so bile 72 ur izpostavljene kondicioniranemu gojišču (redčenje 1 : 1 z eksperimentalnim) celic U87. Celice kontrole so rasle samo v eksperimentalnem gojišču. Celice smo nato fiksirali in jih obarvali z barvilom akridin oranž. Vpliv je statistično značilen, če je $p < 0.05$ (*).

4.2.4.2 Določanje vpliva MMC na pogostost apoptoze pri celicah U87

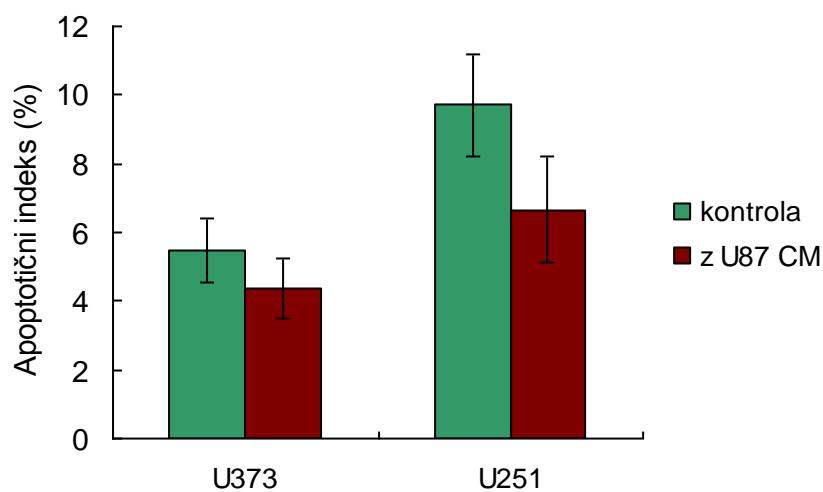
Iz slike 28 je razvidno, da je bilo v kontroli celic U87 apoptotičnih celic 0,79 %, vpliv kondicioniranega gojišča MMC1 je zmanjšal njihovo apoptozo na 0,32 % (apoptoza se je zmanjšala za 59 %), vpliv CM MMC2 pa na 0,59 % (apoptoza se je zmanjšala za 25 %). Vpliv kondicioniranega gojišča MMC1 je statistično značilno vplival na pogostost apoptoze celic U87, pri MMC2 CM pa je razlika opazna, vendar ni statistično značilna.



Slika 28: Vpliv MMC na pogostost apoptoze pri celicah U87. Celice U87 so bile 72 ur izpostavljene kondicioniranemu gojišču MMC (redčenje 1 : 1 z eksperimentalnim). Celice kontrole so rasle samo v eksperimentalnem gojišču. Celice smo nato fiksirali in jih obarvali z barvilom akridin oranž. Vpliv je statistično značilen, če je $p < 0.05$ (*).

4.2.4.3 Določanje vpliva celic U87 na pogostost apoptoze pri celicah U373 in U251

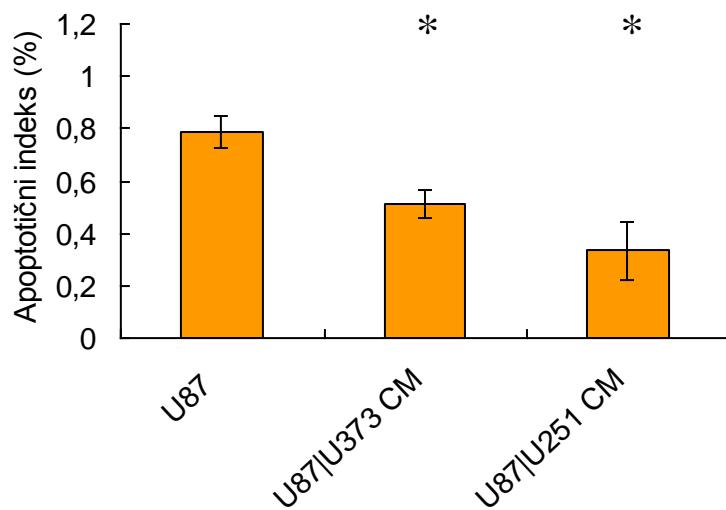
Iz slike 29 je razvidno, da vpliv CM celic U87 zmanjšuje prisotnost apoptoze pri MMC, vendar razlike niso bile statistično značilne. V kontroli celic U373 je bilo apoptotičnih celic 5,45 %, pri U251 pa 9,72 %. Vpliv kondicioniranega gojišča celic U87 je pri celicah U373 zmanjšal pogostot apoptoze za 20 %, pri U251 pa za 32 %.



Slika 29: Vpliv celic U87 na pogostost apoptoze pri celicah U373 in U251. Celice U373 in U251 so bile 72 ur izpostavljene kondicioniranemu gojišču (redčenje 1 : 1 z eksperimentalnim) celic U87. Celice kontrole so rasle samo v eksperimentalnem gojišču. Celice smo nato fiksirali in jih obarvali z barvilom akridin oranž. Vpliv je statistično značilen, če je $p < 0.05$ (*).

4.2.4.4 Določanje vpliva celic U373 in U251 na pogostost apoptoze pri celicah U87

Iz slike 30 je razvidno, da se pri celicah U87, ki so rasle v kondicioniranem gojišču celic U373 in U251, statistično značilno zmanjša pogostost apoptoze in pri obeh je razlika statistično značilna. V kontroli celic U87, ki so rasle samo v eksperimentalnem gojišču, je bilo apoptotičnih 0,79 %, vpliv CM celic U373 je zmanjšal pogostost apoptoze pri celicah U87 na 0,51 % (pogostost apoptotičnih celic se je manjšala za 35 %), še bolj pa je vplival CM celic U251, ki je apoptotični indeks celic U87 zmanjšal na 0,33 % (pogostost apoptotičnih celic se je zmanjšala za 58 %).



Slika 30: Vpliv celic U373 in U251 na pogostost apoptoze pri celicah U87. Celice U87 so bile 72 ur izpostavljene kondicioniranemu gojišču (redčenje 1 : 1 z eksperimentalnim) celic U373 in U251. Celice kontrole so rasle samo v eksperimentalnem gojišču. Celice smo nato fiksirali in jih obarvali z barvilom akridin oranž. Vpliv je statistično značilen, če je $p < 0.05$ (*).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Med celicami v tkivih obstaja parakrina komunikacija. Osnovni namen diplomske naloge je bil ovrednotiti vpliv humanih mezenhimskih matičnih celic (MMC1 in MMC2) dveh različnih donorjev na tri različne glioblastomske celične linije (GBM – U87, U373, U251) in obratno, vpliv treh različnih linij GBM na MMC na ravni serumske odvisnosti, proliferacije, kromosomske nestabilnosti in pojava apoptoze. Vplive smo preverjali v ko-kulturah ter s kondicioniranim gojiščem, ki ponazarja parakrino komunikacijo med celicami.

5.1.1 Serumska odvisnost

Pogoji *in vitro* kultivacije MMC vplivajo na njihov proliferacijski potencial ter diferenciacijske sposobnosti, kar se izraža v različni morfologiji celic/celične linije. Kadar jih gojimo v normalnih pogojih *in vitro*, MMC rastejo v enem sloju, če pa pogoji postanejo hipoksični (pomanjkanje kisika), začnejo celice pospešeno rasti in dosežejo do 30-kratno povečanje rasti (Grayson in sod., 2007). Pri gojenju celic za klinično uporabo bo potrebno optimizirati postopke izolacije, gojenja in diferenciacije matičnih celic. Pomembna je gostota celic, ki jo nasadimo v gojitveno posodo, koncentracija seruma v gojišču, kakovost gojišča in inkubacijski čas (Thomas in sod., 2008). Uporaba ustreznega gojišča je najpomembnejša stvar za uspešno gojenje MMC. Osnovno gojišče vsebuje glukozo, aminokisline, ione vključno s kalcijem, magnezijem, kalijem, natrijem, fosfatom in dodanim živalskim serumom v koncentraciji od 10 do 20 % (Eagle, 1955).

Serum igra pomembno vlogo pri spodbujanju celične rasti *in vitro* z zagotavljanjem bistvenih faktorjev, kot so aminokisline, minerali, rastni faktorji in hormoni, vsebuje vitamine in druge faktorje, deluje kot pH pufer in zagotavlja inhibitorje proteaz (Nolta, 2006). Pri poskusu serumske odvisnosti smo opazovali odziv posameznih celičnih linij pri različni koncentraciji seruma v gojišču (0, 1, 10, 20 %). Pri MMC se je proliferacija povečevala sorazmerno s povečevanjem vsebnosti seruma v gojišču, največja je bila pri 20 % koncentraciji seruma. V nekaterih objavah so pri raziskavah uporabili 10 % FBS v gojišču (Sotiropoulou in sod., 2005; Sart in sod., 2010; Perez-Ilzarbe in sod., 2009) v nekaterih pa 20 % (Shahdadfar in sod., 2005; Liu in sod., 2007). Z uporabo 10 % FBS še vedno lahko zagotovimo dobro proliferacijo celic ter porabimo manj seruma, lahko pa uporabimo manj seruma in v gojišče dodamo kemično definirane pripravke rastnih faktorjev. Z našim rezultatom smo potrdili rezultate raziskave Yokoyame in sod. (2008), ki so v poskusu uporabili koncentracijo 0,1 %, 1 % in 10 %, ter dobili podoben trend, vendar so namesto DMEM osnovnega gojišča uporabili MF gojišče, da so izboljšali proliferacijo. Ugotavljajo tudi, da obstaja možnost, da FBS v gojišču pospeši diferenciacijo celic. Enak trend v poskusu z avtolognim serumom (AS) so ugotovili tudi Stute in sod. (2004), kjer je bila proliferacija celic v 10 % avtognem serumu primerljiva s tisto v 10 % FBS, v poskusu pa so uporabili 1, 3 in 10 % avtologni serum. Kot kažejo naši rezultati, MMC rastejo tudi v gojišču brez seruma, kar so dokazali tudi Pochampally in sod. (2004), saj so celice preživele v gojišču brez FBS od 2 do 4 tedne. Klon MMC1 je počasneje rastoči klon

kot MMC2 (Motaln in sod., 2010), kar lahko opazimo na sliki 14. Pred uporabo je potrebno serum temeljito testirati, kar nakazuje, da bi bilo gojišče nujno potreбno kemično definirati (Nolta, 2006). Z uporabo FBS pride v gojišče tudi nezaželen vir ksenogenih antigenov ter tveganje za prenos onesnaženja (prioni, virusi, zoonoze). Obstaja tudi potencialna možnost za sekundarne učinke pri kasnejši klinični uporabi MMC (Berger in sod., 2006). Zaradi tega se lahko ob dodatku večje količine seruma v gojišče (od 10–20 %) prikrijejo ali spremenijo učinki drugih dodanih faktorjev (Nolta, 2006).

Protokoli za gojenje MMC standardno predvidevajo uporabo topotno inaktiviranega serauma govejih zarodkov (FBS). Vendar ima uporaba FBS poleg zgoraj omenjenih potencialnih virov okužbe tudi ekonomske, etične in znanstvene zadržke, zato so raziskave usmerjene k pridobivanju novih alternativnih zamenjav. Znanstveni problem uporabe FBS je citotoksičnost nekarakteriziranih faktorjev v serumu, nepredvidljive rastne karakteristike celic, različna razpoložljivost, razlike med samimi serijami (lot numbers), tveganje zaradi možnosti kontaminacije z bakterijami, virusi, prioni, nanobakterijami (Simonetti in sod., 2007), mikoplazmami, kvasovkami in endotoksini. Nekaterih od teh ni mogoče odstraniti iz serauma. Poleg tega so serumske komponente, kot so imunoglobulini, transkripcijski faktorji, različni rastni faktorji ter nekatere nedefinirane komponente prisotne v zelo različni količini, kar lahko vpliva na celične funkcije, rast in fenotipsko/genotipsko stabilnost gojenih celic. Problem predstavlja tudi pojav ksenogenih antigenov v serumu, kar bi lahko privedlo do anafilaktičnega imunskega odziva pacienta, ki je prejel MMC. Naslednji velik problem je neetično zbiranje krvi iz telečjih zarodkov ter ogromno število ubitih zarodkov, kar ni v skladu s cilji sodobnih *in vitro* biomedicinskih raziskav, ki zagovarjajo zmanjševanje oz. preprečevanje uporabe živali v znanstvenih raziskavah. Celice za svojo rast nujno potrebujejo specifične rastne faktorje in druge nedefinirane snovi, ki so prisotne v serumu, zato je veliko raziskav usmerjenih k razvijanju novih alternativnih možnosti za zamenjavo njegove uporabe, kot je človeški serum (alogensi in avtologni), alogensi serum iz popkovnične krvi, derivati človeških trombocitov, kemično definirano gojišče, kjer ne uporabimo živalskega serauma (serum-free medium), ampak osnovnemu gojišču samo dodamo kemično določene komponente, ki so drugače prisotne v serumu (Tekkatté in sod., 2011).

V našem poskusu se pri vseh treh GBM celičnih linijah pri koncentraciji 0, 1 in 10 % proliferacija celic povečuje, vrh pa doseže pri 10 % serauma v gojišču. Pri gojenju celičnih linij GBM za uporabo v poskusih smo zasledili različne vrednosti serauma v gojišču. Od 5 % FBS (Camphausen in sod., 2005) do največkrat uporabljenih 10 % FBS v gojišču (Maletinska in sod., 2000; Yu in sod., 2008). Največji preskok kažejo celice U251, saj se pri 10 % serauma proliferacija zelo poveča, nato pa pri 20 % spet precej pade. Na splošno pri različni koncentraciji najbolje rastejo celice U87, ki so tudi najpogostje uporabljeni celični liniji v poskusih na gliomih (Yu in sod., 2008). Tudi za GBM celice razvijajo gojišče brez serauma, ki so mu potem dodani različni rastni faktorji in druge snovi glede na poskus, saj se celice v takem gojišču drugače odzivajo tudi na določene protitumorske učinkovine (Jacobsson in sod., 2000). Rakavim celicam se metabolizem spreminja, so bolj odporne in ne potrebujejo tako optimalnih pogojev za svojo rast. Sposobne so rasti tudi v manj optimalnih pogojih kot je sredica tumorja, kjer vlada hipoksija in pomanjkanje hranil. To se odraža tudi v serumski odvisnosti *in vitro*.

5.1.2 Ovrednotenje proliferacije – barvanje Ki-67

5.1.2.1 Vpliv celic GBM na proliferacijo MMC, in obratno

MMC in celice GBM komunicirajo z izločanjem različnih citokinov, interlevkinov, rastnih faktorjev ter drugih topnih izločkov in tako medsebojno vplivajo na rast in proliferacijo. Kot odziv na te kemokine implantirane MMC potujejo k tumorjem in se vanje vgradijo (Kidd in sod., 2009). Ta sposobnost je danes predmet številnih raziskav na področju mezenhimskega matičnega celica, ker jih želimo uporabiti kot prenašalce različnih terapevtskih učinkov do samega tumorja ter njegovih metastaz.

V dveh različnih poskusih smo žeeli opredeliti odziv MMC na prisotnost celic GBM ali njihovega CM. Pri poskusu s ko-kulturami smo MMC in GBM gojili prostorsko ločene s selektivno prepustno membrano (pore $0,4 \mu\text{m}$), pri drugem poskusu pa smo MMC gojili v kondicioniranem gojišču celic GBM. Za določanje proliferacije smo uporabili metodo barvanja s Ki-67. Iz rezultatov je razvidno, da prisotnost celic GBM oz. njihovega kondicioniranega gojišča pospešuje rast MMC, kar je v skladu z objavo Birnbauma in sod. (2007). Enak trend kaže učinek celic GBM na invazivno sposobnost MMC (Schichor in sod., 2006; Motaln in sod., 2010). MMC v telesu sodelujejo pri regeneraciji poškodovanega tkiva, na mestu poškodbe zmanjšajo vnetje ter se po potrebi diferencirajo v eno ali več tkivnih celic. Tumor organizmu predstavlja tudi neke vrste poškodbo, ogroženost, zato MMC kažejo velik tropizem do njih in migrirajo k njim ter v njihovo sredico. Tumorji privlačijo MMC s kemokini, ki jih izločajo (IL-1, IL-6, IL-8, TGF- β 1, EGF, PDGF, nevrotropini, VEGF-A (Schicor in sod., 2006) in so podobni tistim, ki jih izločajo celice poškodovanega tkiva. Nakamizo (2006) in Birnbaum (2007) sta z uporabo kondicioniranega gojišča glioma celic potrdila migracijo MMC, zaradi citokinov, ki jih izločajo gliomi. Pri poskusu, kjer smo uporabili CM celic GBM, je razlika vidna pri obeh klonih, vedar je samo pri MMC1 statistično značilna. MMC v kontroli so v poskusu s CM rasle intenzivneje, kot v poskusu s ko-kulturami. Klonu MMC1, rastočemu v CM celic GBM, se je proliferacija statistično značilno povečala. Glede na literaturo je klon MMC1 uvrščen med počasnejše rastoče, MMC2 pa med hitreje rastoče klone (Motaln in sod., 2010; Jerič, 2010). To lahko opazimo tudi v našem primeru, če primerjamo kontroli obeh poskusov, saj klon MMC1 raste rahlo počasnejše kot klon MMC2. Kot navaja Motaln s sod. (2010) se proliferacija celic zaradi vpliva GBM poveča le pri počasi rastočih klonih (MMC1), kar se je pokazalo tudi v našem primeru.

Naredili smo tudi obratna poskusa, kjer smo opazovali vpliv klonov MMC1 in MMC2 na proliferacijo celic U87 (GBM). V prvem primeru smo celice gojili v ko-kulturi z MMC1 in MMC2 (Slika 18a), v drugem pa smo uporabili njihovo kondicionirano gojišče (Slika 18b). Rezultati kažejo, da so MMC zaviralno delovale na proliferacijo celic GBM, kar je v skladu z objavo Qiao in sod. (2008), ki pravi, da MMC lahko zavirajo rast tumorja *in vivo* ter zmanjšajo proliferacijo/invazijo celic hepatoma in glioma *in vitro*. Tudi Kucerova s sod. (2010) pravi, da MMC zavirajo proliferacijo glioblastomske celične linije 8MGBA ter incidento tumorja ter, da ko-kulture 8MGBA|MMC spominjajo na vnetje (Mantovani in sod., 2008). Nakamizo s sod. (2006) je v poskusu *in vivo* na živalih pokazal zdravilni učinek MMC, ki so sproščale interferon β , na vsadek celic U87. Enak trend zmanjševanja se kaže tudi pri vplivu MMC na invazivno sposobnost celic GBM. MMC zavirajo maligni

fenotip rakavih celic z zmanjševanjem izražanja onkogenov (c-myc, jedrni antigen proliferajočih celic, survivin in β -katenin) in povečujejo latentno dobo tumorja (Qiao in sod., 2008). Če opazujemo kontrolo celic U87 (GBM) pri obeh poskusih, lahko opazimo, da celice v poskušu s ko-kulturami bolj proliferirajo.

5.1.2.2 Vpliv celic U87 na proliferacijo celic U373 in U251, ter obratno

Multiformni glioblastom je najbolj pogost in smrten primarni rak centralnega živčnega sistema. Tumorji imajo zelo dobro razvit žilni sistem, so zelo odporni na radio- in kemoterapijo, lahko globoko difundirajo v zdravo okoliško možganovino in jih je zaradi tega težko kirurško odstraniti (Fulci in sod., 2002). GBM so tako poimenovali zaradi velike heterogenosti, saj ga sestavlja veliko različnih celičnih tipov, ki imajo različno morfologijo in različno fiziologijo rasti. Celice, izolirane iz multiformnega glioblastoma, imajo različno količino citoplazme. Veliko jih je zvezdaste oblike, prisotne so multipolarne celice. Opazimo lahko jedrni plemorfizem in večjedrne celice. V naših poskusih smo uporabili celični tip U87 z zvezdasto obliko ter celična tipa U251 in U373, ki sta majhna in okrogla oblike. Najbolj so invazivne celice U251, manj U373 in najmanj U87 (Motaln in sod., 2009). Zanimalo nas je, kako celice U87 in njihovi izločki vplivajo na celice U251 in U373 ter obratno. Uporabili smo metodo barvanja na antigen Ki-67.

V obeh primerih, tako pri ko-kulturah kot pri poskušu s CM, lahko opazimo, da celice U87 zaviralno delujejo na proliferacijo celic U373 in U251, torej je najmanj invaziven klon (U87) zmanjšal proliferacijo dveh bolj invazivnih (U251 in U373), vendar pri obeh s približno enako intenzitetu. Če primerjamo kontrole medsebojnega vpliva celic GBM, lahko opazimo, da ima najvišjo proliferacijo U373, sledita mu U251 in U87, kar se ne sklada z objavljenimi rezultati poskusa Špelič (2009), kjer so celice U87 proliferirale najhitreje, na drugem mestu so bile U251, sledile so še U373. V našem poskušu v obeh primerih (ko-kulture in CM) U373 kažejo višjo proliferacijo, kar bi lahko bila posledica boljše celične kulture U373, napak v nastavitvi poskusa (gostota nacepljenih celic) ali pa individualne napake pri štetju Ki-67 pozitivnih celic. Predvidevamo lahko, da celice U87 zaradi hitre proliferacije in zato večjega izločanja citokinov, zavirajo rast ostalih dveh klonov.

Pri obratnem poskušu smo opazovali vpliv celic U373 in U251 na proliferacijo celic U87 v ko-kulturah in z njihovimi kondicioniranimi gojišči. Celice U373 in U251 so zaviralno delovale na proliferacijo celic U87. V poskušu, kjer so celice U87 rasle v s selektivno membrano (pore 0,4 μm) ločenem prostoru skupaj s celicami U373 in U251, se je njihova proliferacija zmanjšala za 42 % glede na kontrolo. V poskušu s kondicioniranimi gojišči je CM celic U373 in U251 prav tako zaviralno deloval na proliferacijo celic U87, zmanjšala se je za 69 %. Razvidno je, da so U251, ki so bolj invazivne, močneje vplivale na proliferacijo celic U87. Iz poskusov medsebojnega vpliva celic GBM, ki so prisotne v tumorju, lahko sklepamo, da celice zaviralno vplivajo ena na drugo, saj se vsaka »bori« za prevlado. Ene z večjo stopnjo proliferacije (U87), druge z večjo stopnjo invazivne sposobnosti (U251 in U373). V naših poskusih z indirektnimi ko-kulturami je vpliv celic U373 in U251 zmanjšal proliferacijo celic U87. Ker pa je v tumorju specifično mikrookolje (npr. tudi hipoksično okolje v večjih tumorjih), specifična komunikacija med

samimi malignimi celičnimi linijami, komunikacija s celicami v okolju tumorja ter specifične signalne poti, se morajo celice prilagajati na hierarhijo v tumorju. Macklin in Lowengrub (2006) sta odkrila, da je vrsta morfoloških odzivov, ki so odvisni predvsem od tumorskega mikrookolja, razporejena v tri kategorije: invazija tkiva preko fragmentacije zaradi hipoksičnega mikrookolja, invazivna rast proti področju, bogatemu s hranili, in kompaktna rast v tkivu, bogatem s hranili. Tudi Hu in Polyak (2008) sta objavila, da igra tumorsko mikrookolje pomembno vlogo pri nastanku raka, rasti, napredovanju, invaziji in metastaziranju tumorja, vendar so molekularne osnove teh mehanizmov slabo raziskane.

5.1.3 Kromosomska nestabilnost

5.1.3.1 Vpliv celic GBM na pojav mikrojeder pri MMC, in obratno

Poškodbe DNA, ki se izražajo v kromosomskih spremembah, kot so nenormalna oblika kromosomov, izguba dela kromosoma (delecija), podvojitve (duplicacija), translokacije, inverzije in druge spremembe, so glavni razlog za nastanek raka. Te spremembe se v naslednji celični delitvi večinoma izrazijo kot mikrojedra. Zaradi različnih vzrokov, kot so izmikanje regulaciji celičnega cikla, neobčutljivost na rastne inhibitorne signale, izogibanje celični smrti in nesposobnost staranja, pride do prekemerne delitve in kopiranja celic (Hanahan in Weinberg, 2000). Posebej moramo biti previdni pri uporabi MMC v kliničnih aplikacijah, kjer gojimo MMC v pogojih *in vitro*, saj bi se lahko iz senescentne MMC razvila rakasta celica. MMC želimo uporabiti kot transportno sredstvo za različne učinkovine, zato moramo preučiti njihovo morebitno kromosomska nestabilnost, kot odziv na prisotnost GBM celic, ki ponazarjajo tumorsko tkivo.

Opazovali smo vpliv celic GBM na prisotnost mikrojeder pri MMC, kjer smo pri obeh klonih MMC opazili, da se je ob prisotnosti kondicioniranega gojišča celic U87 pogostost mikrojeder zmanjšala. Pri počasi rastočem klonu MMC1 je vpliv CM celic U87 tudi statistično značilen ($p<0,05$). Če primerjamo kontroli MMC1 in MMC2, je razvidno, da ima MMC1 manj MJ/1000 celic kot MMC2. Iz tega sklepam, da se v celici manj kromosomskih poškodb izrazi kot MJ, ker klon počasneje proliferira (Motaln in sod., 2010), celice počasneje pridejo skozi celično delitev in kromosomske spremembe se počasneje izražajo v obliki MJ. MMC, ki preidejo v senescentno fazo, kjer je zaustavljenja njihova proliferacija v 30 % izražajo trisomijo kromosoma 8 (Rubio in sod., 2005), kar bi lahko vplivalo na naše rezultate, vendar smo uporabljali celice do pasaže 10. V poskusu nismo uporabili testa CBMN (angl. *cytokinesis-block micronucleus assay*), kjer s citohalazinom B blokiramo citokinezo (delitev citoplazme na dve celici) z razkrojem kontraktilnega obroča (Fenech, 2000), zato rezultati niso tako natančni. Pri nadaljnjih študijah bo potrebno veliko pozornosti usmeriti tudi v epigenetske spremembe in senescencijo MMC gojenih *in vitro*, saj se lahko pojavljajo potencialno nevarne genetske anomalije (Motaln in sod., 2010).

Za tumorske celice so značilne kromosomske poškodbe, ki posledično vodijo do nenadzorovane rasti tumorske mase. Zato smo pri celicah GBM pričakovali večjo prisotnost mikrojeder kot pri MMC, kar so naši poskusi potrdili. Vpliv kondicioniranega gojišča MMC je zmanjšal pogostost mikrojeder pri celicah U87 (GBM). Vpliv CM celic počasi rastočega klena MMC1 je malo večji kot vpliv CM hitreje rastočih MMC2. Tako

kot se pod vplivom CM MMC zmanjša prisotnost MJ pri U87 se je zmanjšala tudi proliferacija, kar je mogoče povezano s tem, da se manjkrat delijo in je zato manj MJ, vendar test MTT ni pokazal, da bi MMC1 rasle počasneje. MMC v telesu, z migriranjem na mesto poškodbe ali vnetja ter izločanjem rastnih faktorjev in citokinov, aktivno sodelujejo pri regeneraciji tkiv. Predpostavljam, da se MMC na tumorske celice in njihove topne faktorje odzivajo kot na poškodbo tkiva. Podobno navajajo tudi Kucerova in sod. (2010) ter Mantovani in sod. (2008), da se ob stiku MMC in GBM ustvari vnetno mikrookolje. Iz tega bi lahko sklepali, da MMC, ki zaradi izločkov tumorskih celic invadirajo v tumorsko sredino, z izločanjem rastnih faktorjev in citokinov na tumorske celice tudi pozitivno in regenerativno vplivajo. Obstaja torej možnost, da bi aplicirane MMC pravilno dosegle poškodovan organ/tumor, vendar ne bi vzpostavile njegove funkcije in bi mogoče celo pospešile rast tumorja (Motaln in sod., 2010). Primer so preddiferencirane kardiomiocite, ki *in vivo* niso uspešno naselile mišjega srca (Tatsumi in sod., 2008) in infuzija prašičjih MMC, ki niso ozdravile poškodbe ledvic (Behr in sod., 2009). To bi se lahko izrazilo tudi v zmanjšanju kromosomskih poškodb. Vsekakor so potrebne nadaljnje raziskave vpliva MMC na tumorske celice, saj je potrebno pri uporabi le-teh za dostavni mehanizem protirakovih učinkovin dobro preučiti tudi vpliv samih celic na tumorsko maso.

5.1.3.2 Vpliv celic U87 na pojav mikrojeder pri celicah U373 in U251, ter obratno

Multiformni glioblastom je sestavljen iz celic, ki imajo različen fenotip in so različnega izvora. Celični tipi med sabo komunicirajo z izločanjem topnih faktorjev. Če celične linije razvrstimo po stopnji invazivnosti, je najbolj invaziven U251, sledi U373, najmanj pa U87 (Motaln in sod., 2009). Če jih razvrstimo glede na hitrost rasti, je najhitreje rastoči U87, sledi U373 in najpočasneje U251 (Špelič, 2009). Preverjali smo, kako trije različni tipi celic GBM (U87, U373 in U251) vplivajo eden na drugega, opazovali pa smo spremembo kromosomske stabilnosti, ki se izraža v pogostosti mikrojeder. Zanimalo nas je, ali se pogostost MJ pri U87 zmanjša ali poveča pod vplivom CM celic U251 in U373, ter obratno.

Vpliv kondicioniranega gojišča celic U87 je pri U373 in U251 povečal število MJ. Pri celicah U373 se je pogostost MJ zaradi vpliva CM U87 povečala za 43 %, pri U251 pa za 17 %. Kontrola U251 ima 150 % več MJ kot kontrola U373. Pri proliferaciji smo imeli obraten trend zmanjševanja celic U251 in U373 zaradi vpliva celic U87. Celice U87 so izmed uporabljenih treh tipov celic GBM najhitreje rastoče, zato bi lahko izločile večjo količino topnih faktorjev, ki bi povzročili povečanje MJ pri celicah U373 in U251, hkrati pa jih zaustavile v rasti. Potrebno bi bilo narediti primerjalni poskus s ko-kulturami, kjer bi celice rasle istočasno v gojišču, ločene samo s filtrom (pore 0,4 µm).

V drugem poskusu, kjer smo celicam U87 dodali kondicionirano gojišče celic U373 in U251, je njihov vpliv zmanjšal pojavnost MJ pri celicah U87. Oba tipa celic GBM sta približno enako zmanjšala pojavnost MJ, vendar je bila le pri CM celic U373 povezava statistično značilna ($p<0,05$). Enak trend smo imeli tudi pri proliferaciji, saj so celice U87 pod vplivom celic U251 in U373 ali njihovega CM zmanjšale svojo proliferacijo. Če primerjamo kontrole vseh treh GBM, opazimo razliko v pogostosti MJ. Največ jih imajo celice U251, sledijo celice U373, najmanj pa se pojavljajo pri U87. Isti trend opazimo pri

invazivnosti posameznih celičnih linij. Glede na hitrost proliferacije pa je ravno obratno: U87, ki je najhitreje rastoč, ima najmanj MJ, najpočasneje rastoč U251 pa jih ima največ. Proliferacija in invazija sta si izključujoči. Iz tega bi lahko sklepali, da ima mogoče U87 najboljše popravljalne mehanizme, ki popravljajo napake pri celični delitvi in odstranjujejo MJ.

5.1.4 Apoptoza

5.1.4.1 Vpliv celic GBM na pojav apoptoze pri MMC, in obratno

Apoptoza je najpogosteša in dobro definirana oblika programirane celične smrti (Jacobson in sod., 1997). Med drugim povzroči razpad jedra in citoplazme v telesca, obdana z membrano (t.i. apoptotska telesa). Apoptotske celice so nenormalne, ker vsebujejo skupek jedrnih fragmentov brez normalnega jedra (Babič, 2008). Z raziskavami želimo ovrednotiti pogostost apoptoze pri mezenhimskeih in GBM celičnih linijah ter učinek celic GBM na MMC, in obratno.

Ob primerjavi kontrol MMC1 in MMC2 lahko vidimo, da je pri MMC1 manj apoptotskih celic, iz česar sklepamo, da zaradi počasnejše proliferacije klena MMC1. Celice, ki so rasle v CM celic U87, imajo manj MJ kot kontrola. Vpliv CM je pri MMC2 bolj opazen, saj proliferirajo hitreje in je učinek vidnejši.

Vpliv CM MMC je torej zmanjšal pogostost apoptoze pri celicah U87. MMC delujejo regenerativno na poškodovana tkiva in pomagajo vzpostavljati homeostazo, zato bi lahko v tem primeru pozitivno vplivale na celični cikel tumorskih celic in tudi učinkovale na njihove popravljalne mehanizme ter tako zmanjšale njihovo apoptozo. Potrebne so nadaljnje raziskave, ki bodo podrobno razjasnile učinek implantiranih MMC v tumorju.

5.1.4.2 Vpliv celic U87 na pojav apoptoze pri celicah U373 in U251 ter obratno

Rakave celice so razvile sposobnost izogibanja apoptotskim mehanizmom, zato se kljub poškodbam neomejeno delijo. Mutacije v proapoptotskem tumorsupresorskem genu p53 so najpogosteše genetske napake pri človeškem raku (Lai in sod., 2007). Odpornost proti apoptozi je tesno povezana s tumorigenezo (Maher, 2008).

Ugotavliali smo medsebojne interakcije treh celičnih linij GBM (U87, U373 in U251). V poskusu smo preverjali pogostost apoptoze pri celicah U251 in U373, ki so rasle v CM celic U87. Rezultati kažejo zmanjšanje števila apoptotičnih celic zaradi učinka CM. Pri celicah U251 je učinek večji kot pri U373.

V obratnem poskusu so celice U87 rasle v CM celic U373 in U251. Topni faktorji, ki so jih celice izločale v kondicionirano gojišče, so statistično značilno zmanjšali pogostost apoptoze celic U87. Ker celične linije skupaj rastejo v tumorski masi, rezultat kaže, da si med sabo pomagajo vzpostavljati ravnovesje. Celice ena na drugo pozitivno vplivajo in z zmanjševanjem apoptotičnih celic je več celic, ki se delijo in tako tumor lahko hitreje raste.

Če primerjamo kontrole vseh treh GBM, je trend isti kot pri MJ. Najmanj apoptotičnih celic ima U87, veliko več pa jih imata U373 in največ U251. Povzamemo lahko, da so celice U251 najbolj maligne, saj imajo največ MJ, največ apoptotskih celic in so najbolj invazivne. Predpostavljamo, da imajo zaradi slabše proliferacije počasnejše popravljalne mehanizme za odstranitev poškodovanih celic iz kulture. Celica U251 sledijo U373, nato pa U87, ki rastejo najhitreje, vendar so najmanj invazivne, imajo najmanj MJ in apoptotičnih celic, kar bi lahko bila posledica uspešnih popravljalnih mehanizmov. Če bi predpostavili, da bi se vse tri celične linije GBM pojavile v istem tumorju, bi mogoče celice U87 predstavljale glavnino tumorske mase, saj hitro rastejo in povečujejo tumor ter se prepletajo v mreže, celice U251 pa bi invadirale v okoliško možganovino in tvorile nove metastaze.

5.2 SKLEPI

- Različna količina seruma v gojišču različno vpliva na proliferacijo MMC in GBM.
- Celice GBM povečajo proliferacijo MMC, obratno pa MMC zavirajo rast GBM.
- Pri interakcijah med GBM CM in ko-kulture s celicami U87 zavirajo rast U373 in U251 ter obratno.
- Kondicionirano gojišče celic U87 vpliva na zmanjšanje prisotnosti MJ v MMC in obratno tudi CM MMC zmanjša prisotnost MJ pri U87.
- CM celic U87 poveča prisotnost MJ pri U373 in U251, pri obratnem poskusu pa se prisotnost MJ pri celicah U87 zmanjša zaradi vpliva CM celic U373 in U251.
- Vpliv CM celic U87 je zmanjšal pojav apoptotičnih celic pri MMC in enako je vpliv CM MMC zmanjšal pogostost apoptoze pri U87.
- Kondicionirano gojišče celic U87 je vplivalo na zmanjšano število apoptotičnih celic pri U373 in U251, enako pa sta CM celic U373 in U251 zmanjšali apoptozo pri U87.

6 POVZETEK

Matične celice so že nekaj časa sinonim upanja za uspešnejše zdravljenje in regeneracijo številnih bolezenskih stanj, med njimi tudi nekaterih zelo agresivnih bolezni, kot je pojav možganskega tumorja v svoji najbolj maligni obliki – Multiformni glioblastom. Ti so zelo agresivni in jih z operacijo ne moremo popolnoma odstraniti, saj posamezne celice invadirajo v okoliško tkivo in tam tvorijo nove metastaze. Mezenhimske matične celice so zaradi svojega regeneracijskega potenciala, multipotentnosti, plastičnosti in enostavnega gojenja v pogojih *in vitro* pomemben kandidat za uporabo pri zdravljenju, saj tudi dokazano migrirajo na mesto tumorja in se vanj vgradijo. Zaradi te lastnosti bi jih uporabili kot transportno sredstvo za prenos protirakovih učinkovin v samo tumorsko maso oziroma do posameznih infiltriranih tumorskih celic.

Pri gojenju celic za klinično uporabo bo potrebno optimizirati postopke izolacije, gojenja in diferenciacije. Serum igra pomembno vlogo pri celični rasti *in vitro*. Sestava seruma je slabo poznana in serum je lahko tudi vir citotoksičnih snovi. Zato so raziskave usmerjene v uporabo gojišča brez seruma z dodatki rastnih in drugih potrebnih faktorjev. Pri MMC se trend rasti povečuje sorazmerno s povečevanjem količine seruma v gojišču. Pri celicah GBM pa je trend povečevanja rasti do 10 % seruma v gojišču, pri 20 % pa proliferacija upade, saj se njihov metabolizem stalno spreminja in prilagaja zaradi hipoksičnih pogojev ter pomanjkanja hranil v tumorju. Zaradi tega niso tako zahtevne glede hranil, kar se je izkazalo v serumskem poskusu *in vitro*.

MMC in celice GBM komunicirajo z izločanjem različnih citokinov, interlevkinov, rastnih faktorjev ter drugih topnih izločkov, in tako medsebojno vplivajo na rast in proliferacijo. V poskusu s ko-kulturami in kondicioniranim gojiščem smo dokazali, da celice GBM povečajo proliferacijo MMC, in sicer bolj pri počasi rastočih kot pri hitreje rastočih klonih. V obratnem poskusu pa smo dokazali, da MMC zavirajo rast celic GBM. Pri primerjavi interakcij med celicami GBM smo opazili, da hitro rastoče U87 zavirajo rast U251 in U373, ter obratno, tudi U373 in U251 zavirajo rast U87.

Kromosomska nestabilnost je glavni znak tumorigeneze. V našem primeru je CM celic U87 zmanjšal prisotnost MJ v MMC. Obratno je tudi CM MMC zmanjšal pogostost MJ pri celicah U87. V poskusu s tremi celičnimi tipi GBM CM celic U87 poveča prisotnost MJ pri U373 in U251, v obratnem poskusu pa se pri U87 prisotnost MJ zmanjša zaradi vpliva CM celic U373 in U251. Če predpostavimo, da bi se te tri celične linije pojavile v istem tumorju, bi lahko celice U87 predstavljale glavnino tumorske mase, saj hitro rastejo in povečujejo tumor ter se prepletajo v mreže, celice U251 pa bi invadirale v okoliško možganovino in tvorile nove metastaze.

Apoptoza je programirana celična smrt, s katero organizem odstrani stare in poškodovane celice. Vpliv CM celic U87 je zmanjšal pojav apoptočnih celic pri MMC in enako je vpliv CM MMC zmanjšal pogostost apoptoze pri celicah U87. Enak rezultat smo dobili pri GBM, CM celic U87 je vplival na zmanjšano število apoptočnih celic pri U373 in U251, enako pa sta CM celic U373 in U251 zmanjšali apoptozo pri U87. Predvidevamo, da imajo celice, ki rastejo hitreje in imajo manj apoptočnih celic boljše popravljalne mehanizme, ki iz kulture odstranijo poškodovane celice.

7 VIRI

Aboody K.S., Brown A., Rainov N.G., Bower K.A., Liu S., Yang W., Small J.E., Herrlinger U., Ourednik V., Black P.M., Breakefield X.O., Snyder E.Y. 2000. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. Proceeding of the National Academy of Science USA, 97, 23: 12846-12851

Alberts B., Bray D., Alviano F., Fossati V., Marchionni C., Franchina M., Lanzoni G., Cantoni S., Cavallini C., Bianchi F., Tazzari P.L., Pasquinelli G., Foroni L., Ventura C., Grossi A., Bagnara G.P. 2007. Term amniotic membrane is high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells *in vitro*. BMC Developmental Biology, 7: 11

Alviano F., Fossati V., Marchionni C., Arpinati M., Bonsi L., Franchina M., Lanzoni G., Cantoni S., Cavallini C., Bianchi F., Tazzari P.L., Pasquinelli G., Foroni L., Ventura C., Grossi A., Bagnara G.P. 2007. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells *in vitro*. BMC Developmental Biology, 7: 11

Anjos-Afonso F., Siapati E.K., Bonnet D. 2004. *In vivo* contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. Scientific; 117: 5655-5664

Babič V. 2008. Uporaba testa mikrojeder pri preučevanju vpliva korenin na rastline. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 48 str.

Behr L., Hekmati M., Lucchini A., Houcine K., Faussat A.M., Borenstein N., Noel L.H., Lelievre-Pegorier M., Laborde K. 2009. Evaluation of the effect of autologous mesenchymal stem cells injection in a large-animal model. Cell Proliferation, 42: 284-297

Berger M.G., Veyrat-Masson R., Rapatel C., Descamps S., Chassagne J., Boiret-Dupre N. 2006. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem Cells*, 24, 12: 2888–2890

Bergers G., Song S., Meyer-Morse N., Bergsland E., Hanahan D. 2003. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *Journal of Clinical Investigations*, 111: 1287-1295

Bexell D., Gunnarsson S., Tormin A., Darabi A., Gisselsson D., Roybon L. 2009. Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas. *Molecular Therapy*, 17: 183-190

Bexell D., Scheding S., Bengzon J. 2010. Toward brain tumor gene therapy using multipotent mesenchymal stem cell vectors. *Molecular Therapy*, 18, 6: 1067-1075

Bianco P., Riminiucci M., Gronthos S., Robey P.G. 2001. Bone marrow stromal stem cells; nature, biology and potential applications. *Stem Cells*, 19: 180-192

Birnbaum T., Roider J., Schankin C., Padovan C., Schochor C., Goldbrunner R., Straube A. 2007. Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *Journal of Neuro-oncology*, 83, 3: 241-247

Bjerkvig R., Tysnes B.B., Aboody K.S., Najbauer J., Terzis A.J.A. 2005. The origin of cancer stem cell: current ontroversis and new insights. *Nature Reviews Cancer*, 5, 11: 899-904

Bjerkvig R., Johansson M., Miletic H., Niclou S.P. 2009. Cancer stem cells and angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19: 279-284

Bongso A., Lee E.H. 2005. Stem cells: their definition, classification and sources. V: *Stem Cells: From Benchtop to Bedside*. Bongso A., Lee E.H., Brenner S., Yeo P. (eds.). Singapore, World Scientific Publishing: 1-13

Brat D.J., Kaur B., Van Meir E.G. 2003. Genetic modulation of hypoxia induced gene expression and angiogenesis: Reliance to brain tumors. *Frontiers in Bioscience*, 8: 100-116

Brighton C.T., Hunt R.M. 1991. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 73, 6: 832-847

Brown D.C., Gatter K.C. 2002. Ki-67: A useful marker for the evaluation of dysplasia in ulcerative colitis. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology*, 51: 327-332

Bruce J.N., Kennedy B. 2009. Glioblastom multiforme. Omaha, eMedicine Oncology: 42
<http://emedicine.medscape.com/article/283252-print> (5. dec. 2010)

Camphausen K., Purow B., Sproull M., Scott T., Ozawa T., Deen D.F., Tofilon P.J. 2005. Influence of *in vivo* growth on human glioma cell line gene expression: Convergent profiles under orthotopic conditions. *Proceedings of the National Academy of Science*, 102, 23: 8287-8292

Can A. 2008. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish Journal of Hematology*, 25: 57-59

Capello E., Vuolo L., Gualandi F. 2009. Autologous hematopoietic stem-cell transplantation in multiple sclerosis: benefits and risks. *Neurological Science*, 30: 175-177

Caplan A. 2010. Mesenchymal stem cells: the past, the present, the future. *Cartilage*, 1: 6-9

Chen L., Tredget E.E., Wu P.Y., Wu Y. 2008. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*, 3, 4: e1886.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18382669> (3. jun. 2011)

Djouad F., Plence P., Bony C., Tropel P., Apparailly F., Sany J. 2003.
Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in
allogenic animals. *Blood*, 102: 3837-3844

Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans
R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining
multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular
Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 4: 315-317

Eagle H. 1955. Nutrition needs of mammalian cells in culture. *Science*, 122: 501-514

Elzaouk L., Moelling K., Pavlovic J. 2006. Anti-tumor activity of mesenchymal stem
cells producing IL-12 in a mouse melanoma model. *Experimental Dermatology*, 15:
865-874

Fan X., Salford L.G., Widegren B. 2007. Glioma stem cells: evidence and limitation.
Seminars in Cancer Biology, 17, 3: 214-218

Fenech M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81-95

Fenech M. 2006. Cytokinesis -block micronucleus assay evolves into a »cytome« assay
of cromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*,
600: 58-66

Fulci G., Ishii N., Maurici D., Gernert K.M., Hainaut P., Kaur B., Van Meir E.G. 2002.
Initiation of human astrocytoma by clonal evolution of cells with progressive loss of
p53 functions in a patient with a 283H TP53 germline mutation: evidence for a
precursor lesion. *Cancer Research*, 62: 2897-2906

Gang E.J., Jeong J.A., Hong S.H., Hwang S.H., Kim S.W., Yang I.H., Ahn C., Han H.,
Kim H. 2004. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated
from human umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22, 4: 617-624

Goodwin H.S., Bicknese A.R., Chien S.N., Bogucki B.D., Quinn C.O., Wall D.A. 2007.

Multilineage differentiation activity by cells isolate from umbilical cord blood: expresion of bone, fat and neuronal markers. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 7: 581-588

Graakjear J., Christensen R., Kolvraa S., Serakinci N. 2007. Mesenchymal stem cells with high telomerase expression do not actively restore their chromosome arm specific telomere lenght pattern after exposure to radiation. *BMC Molecular Biology*, 8: 49

Grayson L.W., Zhao F., Bunnel B., Ma T. 2007. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Community*, 358: 948-953

Greiner Bio-One. 2011. Influence of washing steps on cell attachment: Comparison of PDL-coated and cell culture treats microplates. Biocompare. San Francisco. <http://www.biocompare.com/Articles/ApplicationNote/1605/Influence-Of-Washing-Steps-On-Cell-Attachment-Comparison-Of-PDL-coated-And-Cell-Culture-Treated-Microplates.html> (9. jun. 2011)

Guo J., Li H., Yu C. 2010. Decreased neural stem/progenitor cell proliferation in mice with chronic/nonremitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosignals*, 18, 1: 1-8

Hadjipanayis C.G., Van Meir E.G. 2009. Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends in Molecular Medicine*, 15, 11: 519–530

Hamzah J., Jugold M., Kiessling F., Rigby P., Manzur M., Marti H.H., 2008. Vascular normalization in RGS5-deficient tumors promotes immune destruction. *Nature*, 453: 410-414

Hanahan D., Weinberg R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70

Heddle J.A., Cimino M.C., Hayashi M., Romagna F., Shelby M.D., Tucker J.D., Vanparys P., MacGregor J.T. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, future. Environmental and Molecular Mutagenesis, 18: 277-291

Hematopoietic and mesenchymal stromal cell pathway. 2010. Abcam.
<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11815> (23. nov. 2010)

Ho A.D., Wagner W. 2007. The beauty of asymmetry-asymmetric divisions and self-renewal in the hematopoietic system. Current Opinion in Hematology, 14, 4: 330-336

Hong X., Miller C., Savant-Bhonsale S., Kalkanis S.N. 2009. Antitumor treatment using interleukin-12-secreting marrow stromal cells in an invasive glioma model. Neurosurgery, 64: 1139-1146

Holland E.C. 2000. Glioblastoma multiforme: The terminator. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 97, 12: 6242-6244

Hu M., Polyak K. 2008. Molecular characterisation of the tumor microenvironment in breast cancer. European Journal of Cancer, 44: 2760-2765

Ichimura K., Schmidt E.E., Miyakawa A., Goike H.M., Collins V.P. 1998. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. Genes, Chromosomes and Cancer, 22, 1: 9-15

Izadpanah R., Kaushal D., Kriedt C. in drugi. 2008. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. Cancer Research, 68: 4229-4238

Jackson L., Jones D.R., Scotting P., Sottile V. 2007. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. Journal of Postgraduate Medicine, 53, 2: 121-127

Jacobson M.D., Weil M., Raff M.C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88: 347-354

Jacobsson S.O.P., Rongard E., Stridh M., Tiger G., Fowler C.J. 2000. Serum-dependent effects of Tamoxifen and Cannabinoids upon C6 glioma cell viability. *Biochemical Pharmacology*, 60: 1807-1813

Jerič B. 2010. Vsebnost cisteinskih proteaz kot pokazatelj invazivnosti v humanih mezenhimskih matičnih celicah v primerjavi z glioblastomskimi celičnimi linijami U87-MG, U373 in U251. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije: 101 str.

Karussis D., Kassis I., Kurkalli B.G., Slavin S. 2008. Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative diseases. *Journal of Neurological Science*, 256: 131-135

Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H., Bieback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. *Stem Cells*, 24, 5: 1294-1301

Kidd S., Spaeth E., Dembinski J.L., Dietrich M., Watson K., Kloop A., Battula V.L., Weil M., Andreeff M., Marini F.C. 2009. Direct evidence od mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescence imaging. *Stem Cells*, 27, 10: 2614-2623

Kinnaird T., Stabile E., Burnett M. S., Shou M., Lee C. W., Barr S., Fuchs S., Epstein S. E. 2004. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation Research*, 94, 5: 678-685

Klopp A.H., Spaeth E.L., Dembinski J.L., Woodward W.A., Munshi A., Meyn R.E. 2007. Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. *Cancer Research*, 67: 11687-11695

Kogler G., Sensken S., Wernet P. 2006. Comparative generation and characterisation of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Experimental Hematology*, 34, 11: 1589-1595

Komarova S., Kawakami Y., Stoff-Khalili M.A., Curiel D.T., Pereboeva L. 2006. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Molecular Cancer Therapy*, 5: 755-766

Krause D.S. 2002. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Therapy*, 9: 754-758

Kucerova L., Matuskova M., Hlubinova K., Altanerova V., Altaner C. 2010. Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells. *Molecular Cancer*, 9: 129

Lai P.B.S., Chi T.-Y., Chen G.G. 2007. Different levels of p53 induced either apoptosis or cell cycle arrest in a doxycycline-regulated hepatocellular carcinoma cell line in vitro. *Apoptosis*, 12: 387-393

Leung V.Y., Chan D., Cheung K.M. 2006. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations and future direction. *European Spine Journal*, 15: 406-413

Liu C., Wu M., Hwang S. 2007. Optimization of serum free medium for cord blood mesenchymal stem cells. *Biochemical Engineering Journal*, 33: 1-9

Locatelli F., Maccario R., Frassoni F. 2007. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders. *Hematologica*, 92, 7: 872-877

Loebinger M.R., Janes S.M. 2010 Stem cells as vectors for antitumor therapy. *Thorax*, 65: 362-369

Louis D.N., Ohgaki H., Weistler O.D., Cavenee W.K. 2007. WHO Classification of tumours of the central nervous system. Lyon, International Agency for Research on Cancer Press: 312 str.

Macklin P., Lowengrub J. 2006. Nonlinear simulation of the effect of microenvironment on tumor growth. *Journal of Theoretical Biology*, 245: 677-704

Maher K. 2008. Toksičnost ksantahumola na različne vrste normalnih in rakavih celic. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 76 str.

Maletinska L., Blakely A., Bjornstad K.A., Deen D.F., Knoff L.J., Forte T. M. 2000. Human glioblastoma cell lines: Levels of low-density lipoprotein receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein. *Cancer Research*, 60: 2300-2303

Mallam E., Kemp K., Wilkins A., Rice C., Scolding N. 2010. Characterization of in vitro expanded bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 16: 909-918

Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*, 454: 436-444

Martin-Rendon E., Watt S.W. 2003. Stem cell plasticity. *British Journal of Haematology*, 122: 877-891

Miletic H., Fischer Y., Litwak S., Giroglou T., Waerzeggers Y., Winkeler A. 2007. Bystander killing of malignant glioma by bone marrow-derived tumor-infiltrating progenitor cells expressing a suicide gene. *Molecular Therapy*, 15: 1373-1381

Mishra P. J., Humeniuk R., Medina D. J., Alexe G., Mesirov J. P. 2008. Carcinoma-associated fibroblasts-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Research*, 68: 4331-4339

Mossman T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *Jornal of Immunological Methods*, 65: 55-67

Motaln H. 2008. Seminar: Nepredvidljivost humanih mezenhimskih matičnih celic. <http://www.nib.si/index.php/aktualno/predavanja/166-seminarji-nib-nepredvidljivost-humanih-mezenhimskih-matichnih-celic.html> (2. feb. 2011)

Motaln H. 2009. »Invazivnost glioblastomskih celičnih linij«. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo (osebni vir, avgust 2010)

Motaln H., Schichor C., Lah T.T. 2010. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer*, 116, 11: 2519-2530

Nagaya N., Fujii T., Iwase T., Ohgushi H., Itoh T., Uematsu M., Yamagishi M., Mori H., Kangawa K., Kitamura S. 2004. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 287, 6: 2670-2676

Nakamizo A., Marini F., Amano T., Khan A., Studeny M., Gumin J., Chen J., Hentschel S., Vecil G., Dembinski J., Andreeff M., Lang F.F. 2006. Human bone marrow – derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Research*, 65, 8: 3307-3318

Nakamura K., Ito Y., Kawano Y., Kurozumi K., Kobune M., Tsuda H. 2004. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Therapy*, 11, 1155-1164

Netter F.H. 1987. Musculoskeletal system: anatomy, physiology and metabolic disorders. New Jersey, WB Saunders: 134

Nolta J.A. 2006. Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells. New York. Springer: 173 str.

Novaković S., Hočevor M., Jezeršek Novaković B., Strojan P., Žgajnar J. 2009. Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. Ljubljana, Mladinska knjiga: 425 str.

Ohgaki H., Kleihues P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. American Journal of Pathology, 170, 5: 1445-1453

Okada H., Mak T.W. 2004. Pathways of apoptotic and non apoptotic death in tumor cells. Nature Reviews Cancer, 4, 8: 592-603

Palmer D.H., Young L.S., Mauntrner V. 2006. Cancer gene-therapy: clinical trials. Trends in Biotechnology, 24:76-82

Pecorino L. 2008. Molecular biology of Cancer. Mechanisms, targets and therapeutics. 2nd edition. New York, Oxford University Press: 311 str.

Perez-Ilzarbe M., Diez-Campelo M., Aranda P., Tabera S., Lopez T., Merino J., Moreno C., Andreu E.J., Prosper F. 2009. Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. Transfusion, 49, 9: 1901-1910

Phillips H.S., Kharbanda S., Chen R., Forrest W.F., Soriano R.H., Wu T.D., Misra A., Nigro J.M., Colman H., Soroceanu L., Williams P.M., Modrusan Z., Feuerstein B.G., Aldape K. 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression and resemble stages in neurogenesis. Cancer Cell, 9, 3: 157-173

Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 284: 143-147

Pitot H.C., 1989. Progression: the terminal stage in carcinogenesis. Japanese Journal of Cancer Research, 80: 599-607

Pochampally R.R., Smith J.R., Ylostalo J., Prockop D.J. 2004. Serum deprivation of mesenchymal stem cells selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood Journal*, 103: 1647-1652

Power A.T., Bell J.C. 2007. Cell-based delivery of oncolytic viruses: a new strategic alliance for a biological strike against cancer. *Molecular Therapy*, 15: 660-665

Pulkkanen K. J., Yla-Herttula S. 2005. Gene therapy for malignant glioma: current clinical status. *Molecular Therapy*, 12: 585-598

Qiao L., Xu Z., Zhao Z., Shi M., Zhao R.C., Ye L., Zhang X. 2008. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in hepatoma model. *Cancer Research*, 18: 500-507

Qwikstep. 2011. <http://qwikstep.eu/search/hemocytometer-counting.html> (8 . jun. 2011)

Rada T., Reis R.L., Gomes M.E. 2009. Adipose tissue-derived stem cells and thier application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering*, 15: 125-113

Ramzi C., Vinay K., Tuker C. 1999. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6th ed. Philadelphia. W. B. Saunders: 1425 str.

Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. 2001. Stem cells, cancer cells and cancer stem cells. *Nature* 414, 6859: 105-111

Rožman P., Jež M. 2010. Matične celice in napredno zdravljenje (zdravljenje s celicami, gensko zdravljenje in tkivno inženirstvo) – »Pojmovnik«. Ljubljana, Društvo za celično in tkivno inžinirstvo Slovenije.
http://www.dctis.org/terminoloski_koticek/SC_slovarcek_SLO20.pdf (3. jun. 2011)

Rubio D., Garcia-Castro J., Martín M.C., Fuente R., Cigudosa J.C., Lloyd A.C., Bernad A. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Research*, 65, 8: 3035-3039

Ryan J.M., Barry P.F., Murphy J.M., Mahon B.P. 2005. Mesenchymal stem cells avoid allogenic rejection. *Journal of Inflammation*, 2, 8: 1-11

Sart S., Schneider Y.J., Agathos S.N. 2010. Influence of culture parameters on ear mesenchymal stem cells expanded on microcarriers. *Journal of Biotechnology*, 150, 1: 149-160

Sato H., Kuwashima N., Sakaida T., Hatano M., Dusak J.E., Felows-Mayle W.K. 2005. Epidermal growth factor receptor-transfected bone marrow stromal cells exhibit enhanced migratory response and therapeutic potential against murine brain tumors. *Cancer Gene Therapy*, 12: 757-768

Schichor C., Birnbaum T., Etminam N., 2006. Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Experimental Neurology*, 199: 301-310

Schöler H.R. 2007. The potential od stem cells: An inventory. V: Human biotechnology as Social Challenge. Nikolaus K., Dagmar S., Stefan L.S. (eds.). Farnham, UK. Ashgate Publishing: str. 28

Scholzen T., Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known to unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182, 3: 311-22

Serša G. 2009. Biološke in molekularne značilnosti malignih celic ter njihove tarče pri zdravljenju raka. *Farmacevtski vestnik*, 60: 43-47

Sever N. 2007. Gojenje celičnih linij. Dokument 10G-POS-02. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo (interno gradivo)

Shahdadfar A., Frønsdal K., Haug T., Reinholt F.P., Brinchmann J.E. 2005. *In vitro* expansion of human mesenchymal stem cells: Choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression and transcriptome stability. *Stem Cells*, 3, 9: 1357-1366

Shibata K.R., Aoyama T., Shima Y., Fukiage K., Otsuka S., Furu M., Kohno Y., Ito K., Fujibayashi S., Neo M., Nakayama T., Nakamura T., Toguchida J. 2007. Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during *in vitro* expansion. *Stem Cells*, 25, 9: 2371-2382

Simonetti A.B., Englert G.E., Campos K. 2007. Nanobacteria-like particles: a threat to cell cultures. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 1: 153–158

Smith I.E. in Dowsett M. Urroticoechea A. 2005. Proliferation Marker Ki-67 in early breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*; 23: 7212-7220

Sonabend A.M., Ulasov I.V., Tyler M.A., Rivera A.A., Mathis J.M., Lesniak M.S. 2008. Mesenchymal stem cells effectively deliver an oncolytic adenovirus to intracranial glioma. *Stem Cells*, 26: 831-841

Sotiropoulou P.A., Perez S.A., Salagianni M., Baxevanis C.N., Papamichail M. 2005. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24, 2: 462-471

Sotiropoulou P.A., Perez S.A., Salagianni M., Baxevanis C.N., Papamichail M. 2006. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cells research. *Stem Cells*, 24: 1409-1410

Spaeth E.L., Dembinski J.L., Sasser A.K., Watson K., Klopp A., Hall B. 2009. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS ONE* 4: 4992 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19352430> (5. jun. 2011)

Spees J.L., Olson S.D., Ylostalo J., Lynch P.J., Smith J., Perry A., Peister A., Wang M.Y., Prockop D.J. 2003. Differentiation, cell fusion and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 2397-2402

Stanley L.A. 1995. Molecular aspects of chemical carcinogenesis: the roles of oncogenes and tumor suppressor genes. *Toxicology*, 96: 173-194

Stolzing A., Jones E., Gonagle D., Scutt A. 2008. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129, 3: 163-173

Strbad M., Rožman P. 2005. Uporaba matičnih celic v medicini. *Proteus*, 67, 8: 340-348

Strbad M. 2004. Osamitev in opredelitev matičnih celic iz kostnega mozga. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 77 str.

Studeny M., Marini F.C., Champlin R.E., Zompetta C., Fidler I.J., Andreeff M. 2002. Bone-marrow derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Research*, 62: 3603-3608

Stute N., Holtz K., Bubenheim M., Lange C., Blake F., Zander A.R. 2004. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Experimental Hematology*, 32: 1212-1225

Špelič G. 2009. Medsebojni vpliv mezenhimskih matičnih celic in celic glioma na rast in proliferacijo. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 77 str.

Šuštar T. 2010. Primerjava tumorskih matičnih celic gliomov z normalnimi nevroepiteljiskimi matičnimi celicami na ravni informacijske RNA (mRNA). Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije: 57 str.

Tang Y.L., Zhao Q., Qin X., Shen L., Cheng L., Ge J., Phillips M.I. 2005. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *The Annals of Thoracic Surgery*, 80, 1: 229-236

Tatsumi K., Otani H., Sato D. 2008. Granulocyte-colony stimulating factor increases donor mesenchymal stem cells in bone marrow and their mobilization into peripheral circulation but does not repair dystrophic heart after bone marrow transplantation. *Circulation Journal*, 72: 1351-1358

Tekkatt C., Gunasingh G.P., Cherian K.M., Sankaranarayanan K. 2011. "Humanized" Stem Cell Culture Techniques: The Animal Serum Controversy. *Stem Cells International*, vol. 2011.

<http://www.sage-hindawi.com/journals/sci/2011/504723> (12. maj 2011)

The p53 tumor suppressor protein. *Genes and disease*. 2008. United States National Institutes of Health.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22268/> (5. jun. 2011)

Thomas R.J., Hourd P.C., Williams D.J. 2008. Application of process quality engineering techniques. *Journal of Biotechnology*, 136: 148-155

Ucelli A., Moretta L., Pistoia V. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 8: 726-736

Verhaak R.G.W., Hoadley K.A., Purdom E., Wang V., Qi Y., Wilkerson M.D., Miller R.C., Ding L., Golub T., Mesirov J.P., Alexe G., Lawrence M., O'Kelly M., Tamayo P., Weir B.A., Gabriel S., Winckler W., Gupta S., Jakkula L., Feiler H.S., Hodgson J.G., James C.D., Sarkaria J.N., Brennan C., Kahn A., Spellman P.T., Wilson R.K., Speed T.P., Gray J.W., Meyerson M., Getz G., Perou C.M., Hayes D.N. 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell*, 17, 1: 98-110

Wang Y., Huso D.L., Harrington J., Kellner J., Jeong D.K., Turney J., McNiece I.K.
2005. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM
mesenchymal stem cell culture. *Cyotherapy*, 7, 6: 509-519

Wilson A., Trumpp A. 2006. Bone-marrow hematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology*, 6, 2: 93-106

Wojakowski W., Kucia M., Kazmierski M., Ratajczak M.Z., Tendera M. 2008.
Circulating progenitor cells in stable coronary heart disease and acute coronary
syndromes: relevant reparatory mechanism. *Heart*, 94, 1: 27-33

Von Deimling A., Fimmers R., Schmidt M.C., Bender B., Fassbender F., Nagel J., Jahnke
R., Kaskel P., Duerr E.M., Koopmann J., Maintz D., Steinbeck S., Wick W., Platten
M., Müller D.J., Przkora R., Waha A., Blümcke B., Wellenreuther R., Meyer-Puttlitz
B., Schmidt O., Mollenhauer J., Poustka R., Stangl A.P., Lenartz D., Von Ammon K.
2000. Chomprehensive allelotype and genetic analysis of 466 human nervous system
tumors. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 59, 6: 544-558

Xin H., Kanehira M., Mizuguchi H., Hayakawa T., Kikuchi T., Nukiwa T. 2007.
Targeted delivery of CX3CL1 to multiple lung tumors by mesenchymal stem cells.
Stem Cells, 25: 1618-1626

Xu G., Jiang X.D., Xu Y., Zang J., Huang F.H., Chen Z.Z. 2009. Adenoviral-mediated
interleukin-18 expression in mesenchymal stem cells effectively suppresses the
growth of glioma in rats. *Cell Biology International*, 33: 466-474

Yamamoto M., Curiel D.T. 2010. Current issues and future directions of oncolytic
adenoviruses. *Molecular Theraphy*, 18: 243-250

Yang J., Yan Y., Cric B. 2010. Evaluation of bone marrow- and brain-derived neural
stem cells in therapy of central nervous system autoimmunity. *American Journal of
Pathology*; 177: 1989-2001

Yokoyama M., Miwa H., Maeda S., Wakiani S., Takagi M. 2008. Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 1: 46-50

Yong R.L., Shinojima N., Fueyo J., Gumin J., Vecil G.G., Marini F.C. 2009. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer Research*, 69: 8932-8940

Yu S., Ping Y., Yi L., Zhou Z., Chen J., Yao X., Gao L., Wang J.M., Bian X. 2008. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Letters*, 256: 124-134

Zipori D. 2005. The Stem State: Plasticity Is Essential, Whereas Self-Renewal and Hierarchy Are Optional. *Stem Cells*, 23: 719-726

ZAHVALA

Zahvaljujem se somentorici asist. dr. Heleni Motaln za pomoč pri raziskovalnem delu, za vse spodbudne besede, potrpežljivost in strokovne razlage. Najlepše se ji zahvaljujem za usmerjanje, pomoč in hiter pregled diplomske naloge. Hkrati se zahvaljujem tudi Nacionalnemu inštitutu za biologijo, ki mi je omogočil izvedbo raziskovalnega dela naloge. Vsem zaposlenim se zahvaljujem za spodbudo in pomoč, še posebej pa Anji Pucer in Anji Bubik.

Mentorici doc. dr. Tanji Kunej se iskreno zahvaljujem za vse spodbudne besede, nasvete in pomoč ter hiter pregled naloge.

Zahvaljujem se tudi predsedniku komisije prof. dr. Ivanu Štuhcu in recenzentu prof. dr. Petru Dovču za pregled naloge in strokovne nasvete.

Hvala osebju knjižnice Oddelka za zootehniko za pregled naloge in lektoriranje izvlečka.

Ga. Sabini Knehtl se iskreno zahvaljujem za njeno potrpežljivost, velikodušnost in neverjetno pripravljenost za pomoč pri urejanju vseh administrativnih zadev v času študija.

Moji družini bi se zahvalila za vso finančno podporo v času študija, za vse spodbudne besede, nasvete, potrpežljivost in za dom v neokrnjeni naravi, kjer se vedno lahko spočijem in naberem novih moči.

Za vse neštete lepe trenutke, drobne nasvete, spodbudne besede, neskončne pogovore... se zahvaljujem Ani, Barbari, Katarini in cimri Blanki ter Karolini, Maši in Mateji pa tudi vsem ostalim sošolcem in sošolkam. Maši se posebej zahvaljujem za pomoč pri prevajanju angleškega izvlečka in Alenki za lektoriranje.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Petra HVALA

**PRIMERJAVA FENOTIPSKIH LASTNOSTI
MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IN
GLIOBLASTOMSKIH CELIČNIH LINIJ V
INDIREKTNI KO-KULTURI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

