

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Mojca JEŽ

**IDENTIFIKACIJA CELIC Z EMBRIONALNIMI
LASTNOSTMI V KOSTNEM MOZGU ODRASLEGA
ČLOVEKA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Mojca JEŽ

**IDENTIFIKACIJA CELIC Z EMBRIONALNIMI LASTNOSTMI V
KOSTNEM MOZGU ODRAŠLEGA ČLOVEKA**

DIPLOMSKO DELO
univerzitetni študij

**IDENTIFICATION OF STEM CELLS WITH EMBRYONIC
CHARACTER IN THE ADULT HUMAN BONE MARROW**

GRADUATION THESIS
university studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v celičnem laboratoriju centra za imunohematologijo na Zavodau RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani, v sodelovanju s Kliničnim oddelkom za hematologijo.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 2. 07. 2008 za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miomirja Kneževiča, za somentorja doc. dr. Primoža Rožmana in za recenzenta prof. dr. Petra Dovča.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: doc. dr. Miomir KNEŽEVIČ, univ. dipl. biol.
Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Član: doc. dr. Primož ROŽMAN, dr. med.
Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

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

Datum zagovora:

Izjavljam, da je naloga 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.

Mojca JEŽ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 576.35 : 611.013.1 : 57.086.83 (043.2)
KG	Embrionalne matične celice/kostni mozeg /MAPC/VSEL/embrionalne matične celice odraslega/embrionalne lastnosti/ESC-A/oogeneza <i>in vitro</i>
AV	JEŽ, Mojca
SA	KNEŽEVIČ, Miomir (mentor)/ROŽMAN, Primož (somentor)
KZ	SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2008
IN	IDENTIFIKACIJA CELIC Z EMBRIONALNIMI LASTNOSTMI V KOSTNEM MOZGU ODRASLEGA ČLOVEKA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 60 [2] str., 14 pregl., 36 sl., 1 pril., 83 vir.
IJ	Sl
JI	sl / en
AI	V kostnem mozgu odraslega se nahaja več vrst matičnih celic. Zadnje raziskave kažejo, da se med njimi nahaja subpopulacija malih matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi, ki jih je težko osamiti in dejansko dokazati. Namen diplomskega dela je bil dokazati obstoj teh celic v kostnem mozgu odraslega in pokazati njihove embrionalne lastnosti, še posebej ali so sposobne tvoriti zgodnje progenitorje spolnih celic. Po pridobivanju vzorcev kostnega mozga zdravih preiskovancev, smo najprej izolirali mononuklearne celice z gradientnim centrifugiranjem, pri čemer smo dobili različne plasti. Vse plasti mononuklearnih celic so vsebovale enak ekspresijski profil za embrionalne označevalce (pozitivne za Oct-4A, Oct-4B, Sox2, Nanog in c-kit), kar je pomenilo, da so zgodnje matične celice prisotne v vseh nivojih. Nato smo različne plasti izoliranih mononuklearnih celic gojili v treh različnih gojiščih ob dodatkih rastnih dejavnikov, kot sta bFGF in TGFβ ter folikularna tekočina. Po dvajsetdnevem gojenju, med katerim smo pozorno spremljali morfologijo celic, smo iz kultur, izolirali skupno RNA in z metodo RT-PCR preverili ekspresijo germinalnih označevalcev (c-kit, SCP3, VASA, ZP2 in ZP3). V kulturi, kjer smo celice gojili v mediju z dodatkom folikularne tekočine, so se razvile velike okrogle celice (premer 80 μm), z metodo RT-PCR pa smo pokazali, da so celice izražale c-kit, VASA in SCP3. Dobljeni rezultati potrjujejo, da se v kostnem mozgu odraslih oseb nahaja populacija matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi, ki je sposobna nadaljne diferenciacije. Predvidevamo, da bo te celice bo v prihodnosti mogoče namnožiti in uporabiti v regenerativni medicini.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DD UDK 576.35 : 611.013.1 : 57.086.83 (043.2)
CX Embryonic stem cells/bone marrow/MAPC/VSEL/embryonic-like stem cells of the adult/embryonic characteristics/ESC-A/oogenesis *in vitro*
AU JEŽ, Mojca
AA KNEŽEVIČ, Miomir (supervisor)/ROŽMAN, Primož (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study Programme of Biotechnology
PY 2008
TI IDENTIFICATION OF STEM CELLS WITH EMBRYONIC CHARACTER IN THE ADULT HUMAN BONE MARROW
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIV, 60 [2] p., 14 tab., 36 fig., 1 ann., 83 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Many different stem cell types can be found in adult human bone marrow. Recent research in this field indicates that a subpopulation of very small cells with embryonic character can be found among stem cells in bone marrow. These cells are very rare and very hard to isolate and to characterize. The purpose of this graduation thesis was to prove their existence in adult human bone marrow and to demonstrate their embryonic character, especially their ability to produce early germinal cells. After collection of bone marrow samples from healthy donors, isolation of mononuclear cells was performed using density gradient centrifugation. After centrifugation we got different layers of cells and all of them showed the same expression profile for embryonic markers (positive for Oct-4A, Oct-4B, Sox2, Nanog and c-kit) which indicates that early stem cells populate all layers. Isolated mononuclear cells were cultured in three different media with addition of growth factors (bFGF and TGFβ) and follicular fluid. The morphology was precisely monitored during cultivation. After 20 days of culture the total RNA was isolated and expression of germinal markers (c-kit, SCP3, VASA, ZP2 and ZP3) was confirmed. In the culture where follicular fluid was added, we noticed the development of very large round cells (diameter 80 μm). Using RT-PCR we also demonstrated that these cultures were positive for c-kit, VASA and SCP3. Our results verify that a subpopulation of stem cells with embryonic characteristics exists in adult human bone marrow. In the future these cells could be expanded *in vitro* and then used in regenerative medicine.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	X
Slovarček	XII
1 UVOD	1
1.1 DEFINICIJA	1
1.2 ZGODOVINA RAZISKAV MATIČNIH CELIC	1
1.3 LASTNOSTI MATIČNIH CELIC	6
2 PREGLED OBJAV	9
2.1 RAZLIČNI TIPI PLURIPOTENTNIH MATIČNIH CELIC PRI ODRASLEM	9
2.1.1 Multipotentne prednice odraslega (MAPC)	9
2.1.2 Celice MIAMI	10
2.1.3 Embrionalnim matičnim celicam podobne celice iz popkovnične krvi	11
2.1.4 Celice hMASC	11
2.1.5 Celice VSEL	12
2.1.5.1 Mišje celice VSEL	12
2.1.5.2 Humane celice VSEL	13
2.1.6 Embrionalne matične celice odraslega	14
2.1.7 Povzetek značilnosti pluripotentnih matičnih celic pri odraslem	16
2.2 MATIČNE CELICE Z VPRAŠLJIVO PLURIPOTENTNOSTJO	19
2.2.1 Krvotvorne matične celice	19
2.2.2 Mezenhimske matične celice	20
2.2.3 Endotelijske progenitorske celice	21
3 MATERIAL IN METODE	23
3.1 IDENTIFIKACIJA MATIČNIH CELIC	23
3.2 CILJI RAZISKAVE	23
3.3 DELOVNA HIPOTEZA	23
3.4 POTEK DELA	24
3.5 METODE	25
3.5.1 Pridobivanje vzorcev kostnega mozga zdravih preiskovancev	25
3.5.2 Izolacija mononuklearnih celic z gradientnim centrifugiranjem	25
3.5.2.1 izolacije frakcije MNC s sistemom Accuspin™ Histopaque® – 1077	25
3.5.2.2 Izolacije frakcije MNC z uporabo fikola	26

3.5.3 Ločevanje MNC z gradientnim centrifugiranjem na PureSpermu	27
3.5.4 Gojenje različnih slojev mononuklearnih celic v različnih medijih	28
3.5.4.1 Gojenje celic	28
3.5.4.2 Spremljanje morfologije celic z uporabo svetlobnega mikroskopa	29
3.5.4.3 Priprava folikularne tekočine	29
3.5.5 Izolacija RNA	29
3.5.6 Preverjanje izražanja izbranih embrionalnih označevalcev in označevalcev oogeneze z metodo RT-PCR	30
3.5.6.1 RT-PCR	31
3.5.6.2 Priprava agaroznega gela	33
3.5.6.3 Elektroforeza	34
4 REZULTATI	35
4.1 KULTURA MONONUKLEARNIH CELIC	35
4.2 POSKUS S KOSTNIM MOZGOM PROSTOVOLJKE (KM2)	36
4.2.1 Opazovanje kulture mononuklearnih celic pod mikroskopom in poskus identifikacije zgodnjih matičnih celic	36
4.2.2 Opazovanje kulture mononuklearnih celic pod mikroskopom in poskus identifikacije oocitom podobnih celic	38
4.3 POSKUS S KOSTNIM MOZGOM PROSTOVOLJCA (KM5)	47
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	50
5.1 STARI MODEL MATIČNIH CELIC	50
5.2 PRIHODNJE DELO	52
6 POVZETEK	53
7 VIRI	54
ZAHVALA	
PRILOGA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Lastnosti MC	1
Preglednica 2: Ključna odkritja na področju matičnih celic – pred letom 2000	3
Preglednica 3: Ključna odkritja na področju matičnih celic – novejši dogodki	5
Preglednica 4: MC imajo lahko različno stopnjo potentnosti	6
Preglednica 5: Razlike med hMC odraslega in hEMC	7
Preglednica 6: Matične celice iz kostnega mozga – povzetek označevalcev	17
Preglednica 7: Lastnosti uporabljenih gojišč	28
Preglednica 8: Embrionalni označevalci	30
Preglednica 9: Geni, značilni za oogenezo in za jajčno celico	31
Preglednica 10: Priprava reakcijske mešanice za PCR za en vzorec	31
Preglednica 11: PCR programi	32
Preglednica 12: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za namnoževanje označevalcev oogeneze in embrionalnih označevalcev	33
Preglednica 13: Rezultati RT-PCR za embrionalne označevalce na vzorcih KM2	42
Preglednica 14: Rezultati RT-PCR za označevalce oocit na vzorcih KM2	45

KAZALO SLIK

Slika 1: V različnih razvojnih stopnjah v razvoju osebka se nahajajo MC z različnim razvojnim potencialom. Po trenutno prevladujoči teoriji se s staranjem osebka zmanjšuje potentnost MC	8
Slika 2: Celice MAPC v kulturi	9
Slika 3: Celice MIAMI	10
Slika 4: Embrionalim matičnim celicam podobne celice iz popkovnične krvi	11
Slika 5: Mišje Sca-1 ⁺ lin ⁻ CD45 ⁻ matične celice VSEL in mišje Sca-1 ⁺ lin ⁻ CD45 ⁺ KMC	13
Slika 6: Celice VSEL so pritrjene na fibroblaste iz KM	13
Slika 7: Transmisijaska elektronska mikroskopija: CXCR4 ⁺ lin ⁻ CD45 ⁻ celice iz humane popkovnične krvi	13
Slika 8: Celice ESC-A v kulturi in njihov razvoj v jajčnim podobne celice	14
Slika 9: Oocitom podobne celice, ki naj bi se razvile iz celic ESC-A	15
Slika 10: Mezenhimske matične celice v kulturi	21
Slika 11: Shema poteka dela	24
Slika 12: Izolacija MNC s sistemom Accuspin™ Histopaque® – 1077	25
Slika 13: Izolacija MNC z gradientnim centrifugiranjem na fikolu	27
Slika 14: Separacija MNC na PureSpermu	27
Slika 15: KM v kulturi	35
Slika 16: KM v kulturi, na sredini so vidne maščobne celice	35
Slika 17: Potencialne zgodnje matične celice v kulturi	37
Slika 18: Fotografije celic KM v kulturah tik pred izolacijo RNA po 20 dneh gojenja v mediju MSCGM	38
Slika 19: Fotografije celic KM sloja 2 v kulturah tik pred izolacijo RNA po 20 dneh gojenja v mediju MSCGM z dodatkom F in v mediju mTeSR	39
Slika 20: Kultura KM sloj 3 po 20 dneh gojenja v mediju MSCGM z dodatkom F in mediju mTeSR	40
Slika 21: Kultura KM sloj 4 po 20 dneh gojenja v mediju MSCGM z dodatkom F in mediju mTeSR	40
Slika 22: Kultura KM sloj 5 po 20 dneh gojenja v mediju MSCGM z dodatkom F in mediju mTeSR	41

Slika 23: Kultura KM sloj 6 po 20 dneh gojenja v mediju MSCGM z dodatkom F in mediju mTeSR	42
Slika 24: Elektroforeza za Oct-4AB	43
Slika 25: Elektroforeza za Sox-2 in Nanog	43
Slika 26: Elektroforeza za c-kit	43
Slika 27: Gojenje celic v treh različnih gojiščih	58
Slika 28: Elektroforeza za c-kit	45
Slika 29: Elektroforeza za VASA	46
Slika 30: Elektroforeza za SCP3	46
Slika 31: Elektroforeza za ZP3	46
Slika 32: Elektroforeza za ZP2	47
Slika 33: MNC celice izolirane iz KM5 v kulturi	48
Slika 34: Velika okrogla celica v kulturi KM5	49
Slika 35: Hierarhična organizacija sistema MC	50
Slika 36: Predlagan model razvoja MC in dogodki, ki naj bi bili odgovorni za njihovo plastičnost	51

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
CBE	angl. Cord-blood-derived Embryonic-like Stem Cells (embrionalni matični celici podobna celica iz popkovnične krvi)
CD	označevalec pripadosti (angl. Cluster of Differentiation)
cDNA	komplementarna DNA
Celice EC	embrionalna karcinomska celica
Celice iPS	inducirane pluripotentne celice
DMEM	Dulbeccov modificiran medij (angl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
EMC	embionalna matična celica
EPC	angl. Endothelial Progenitor Cells (endotelijske predniške celice)
ESC-A	angl. Embryonic-like Stem Cell of the Adult (embrionalne matične celice odraslega)
F	folikularna tekočina
FBS	zarodni telečji serum (angl. Fetal Bovine Serum)
GMC	germinalna matična celica
h	humani (pridevnik)
hMASC	angl. Human Multipotent Adult Stem Cell (humana multipotentna matična celica odraslega)
ICM	notranja celična masa (angl. Inner Cell Mass)
KM	kostni mozeg
KMC	krvotvorna matična celica
MAPC	angl. Multipotent Adult Progenitor Cell (multipotentna prednica odraslega)
MC	matična celica
MIAMI	angl. Marrow-isolated Adult Multilineage Inducible Cells
MMC	mezenhimska matična celica (angl. Mesenchymal Stem Cell)
MNC	mononuklearne celice
MSCGM	medij namenjen gojenju mezenhimskih matičnih celic (angl. Mesenchymal Stem Cell Growth Medium)
mTeSR	medij namenjen gojenju embrionalnih matičnih celic
Oct-4	Oktamer-4
PBS	fosfatni pufer (angl. Phosphate Buffered Saline)

PCR	verižna reakcija s polimerazo
RT-PCR	obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo
SCNT	jedrni prenos, kloniranje (angl. Somatic Cell Nuclear Transfer)
SCP3	angl. Synaptonemal Complex Protein 3 (protein 3 sinaptonemičnega kompleksa)
Sox-2	angl. Sex Determining Region Y-box 2
SSEA-1	angl. Stage-specific Embryonic Antigen 1
SSEA-4	angl. Stage-specific Embryonic Antigen 4
TBE	Tris-Borate-EDTA buffer (pufer, ki vsebuje tris, borovo kislino in EDTA)
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija
VSEL	angl. Very Small Embyonic-like Stem Cells (zelo majhne celice podobne embrionalnim matičnim celicam)
ZP	<i>zona pellucida</i>
ZP1	<i>Zona pellucida</i> glikoprotein 1
ZP2	<i>Zona pellucida</i> glikoprotein 2

SLOVARČEK

Pojem	Razlaga
CBE	Embrionalnim matičnim celicam podobne celice iz popkovnične krvi (angl. Cord-blood-derived Embryonic-like Stem Cells), ki so jih leta 2005 odkrili angleški raziskovalci. Celice CBE izražajo embrionalne označevalce Oct-4, SSEA-4 in SSEA-3 ter TRA-1-60 in TRA-1-81 in so negativne za nehumani označevalec SSEA-1.
Embrionalna matična celica	Pluripotentna linija matičnih celic, ki izhajajo iz zgodnjega zarodka (~5 dan), preden se tvorijo embrionalne plasti.
Embrionalnim matičnim celicam podobne celice	Matične celice, ki ne izhajajo iz notranje celične mase blastociste, ampak iz npr. tkiv odraslega človeka izražajo pa lastnosti embrionalnih matičnih celic (pluripotentnost).
EPC	Endotelijske predniške celice (angl. Endothelial Progenitor Cells) izhajajo iz KM in sodelujejo pri nastajanju novih krvnih žil. Njihovo odkritje je pripeljalo do koncepta, da vaskularizacija in angiogeneza lahko potekata simultano v postnatalnem obdobju, saj se lahko celice EPC diferencirajo v vaskularni endotelij.
ESC-A	Embrionalne matične celice odraslega (angl. Embryonic-like Stem cell of the Adult), ki so jih prvič izolirali iz površinskega epitelija jajčnika pri ženskah brez naravno prisotnih foliklov in jajčnih celic. ESC-A so pozitivne za označevalce embrionalnih matičnih celic (Oct-4, Sox-2, Nanog in za površinski antigen SSEA-4), v pogojih <i>in vitro</i> se lahko razvijejo v jajčnim podobne celice in druge tipe celic.
hMASC	Humane multipotentne matične celice odraslega (angl. Human Multipotent Adult Stem Cells) so izolirali iz različnih tkiv, vse so izražale gene značilne za pluripotentne celice Oct-4, Nanog in Rex1, kazale pa so tudi telomerazno aktivnost. Celice hMASC imajo tudi širok diferenciacijski potencial, kar so pokazali tako na morfološki kot tudi na funkcioni ravni.
Krvotvorna matična celica	Matična celica iz katere lahko nastanejo levkociti, eritrociti ali trombociti.
Matična celica	Vse celice, ki lahko stalno producirajo nespremenljive hčerinske celice hkrati pa imajo tudi sposobnost, da producirajo hčerinske celice, ki so v svojem razvojnem potencialu bolj omejene (manjša potentnost).
MIAMI	Celice MIAMI (angl. Marrow-isolated Adult Multilineage Inducible cells) so velike od 7-10 μm , imajo malo citoplazme in se hitro delijo. Morfologija celic ostaja enaka tudi po 52 podvojitvah. <i>In vitro</i> so se celice MIAMI sposobne diferencirati v vse tri embrionalne plasti.
MMC	Mezenhimska matična celica (angl. Mesenchymal Stem cell). MMC spadajo med stromalne celice KM in imajo dvojno vlogo: a) predstavljajo izvirne celice za ne-hematopoetska tkiva in b) hkrati hranilne celice za podporo rasti in diferenciacije krvnih celic in ostalih tkiv, saj sintetizirajo različne komponente zunajceličnega matriksa in različne rastne faktorje.

Multipotentna matična celica	Celica, sposobna tvoriti več linij celic, ki tvorijo celotno tkivo ali tkiva. Primer: krvotvorna matična celica.
Multipotentna prednica odraslega (MAPC)	Celice izolirane iz kostnega mozga in jih lahko diferenciramo v hondrocite, adipocite in kostne celice (angl. Multipotent Adult Progenitor Cell).
Notranja celična masa	Notranja skupina celic v blastocisti, ki v kulturi <i>in vitro</i> tvori embrioidna telesca, iz katerih osamimo embrionalne matične celice
Označevalci (pluripotentni, tkivno specifični)	Genotipski (geni) ali fenotipski (proteini) označevalci, ki so značilni za določen tip celic. Z njimi lahko identificiramo celice.
Plastičnost	Nedokazano opažanje, da tkivne matične celice lahko razširijo svojo potentnost kot odgovor na fiziološke potrebe ali dražljaje.
Pluripotentna matična celica	Celica, sposobna tvoriti vse telesne celice, vključno z germinalnimi celicami in nekaj ali vsa ekstraembrionalna tkiva. Primer so embrionalne matične celice.
Potentnost	Obseg možnosti za končno diferenciacijo celic.
Predniška celica, tudi usmerjena matična celica	Potomska celica matične celice v direktni liniji.
Rakava (tumorska) matična celica	Samoobnavljajoča celica, ki je odgovorna za ohranjanje tumorja, ker producira diferencirane progenitorske celice, ki tvorijo tumor. Prav tumorske matične celice, ki jih je možno identificirati pri nekaterih levkemijah in solidnih tumorjih, so potencialne/kritične terapevtske tarče.
Regenerativna medicina	Veja medicine, ki se ukvarja z obnovo fizioloških funkcij organov in tkiv in pri tem lahko uporablja tudi celice.
Reproduktivno kloniranje	Cilj reproduktivnega kloniranja je ustvariti osebek, ki je genetsko identičen osebk, ki je bil donor somatskega jedra. Klonirani zarodek se nato implantira v maternico, kjer se razvije v osebek.
Samoobnavljanje, Samopomnoževanje	Celične delitve, ki v vsakem ciklu generirajo vsaj eno hčerinsko celico, ki je popolnoma enaka materinski in ima latentno sposobnost diferenciacije. Ta lastnost definira matične celice.
Simetrična celična delitev	Celična delitev, kjer nastaneta dve enaki hčerinski celici.
Somatska celica	Vsaka celica v telesu razen gamet (jajčece in spremiji).
Teratokarcinom	Teratokarcinom je epitelijski malignom, ki je nastal iz prirojene nepravilnosti razvoja katerega organa ali tkiva. Teratomi spadajo med teratokarcinome.
Teratom	Tumor, sestavljen in skupka različnih tkiv. Ti tumorji vsebujejo celice, ki pripadajo vsem trem kličnim plastem.
Totipotentna matična celica	Celica, sposobna tvoriti celoten organizem, vključno s trofoblastom. Totipotentna je zigota, pri rastlinah pa meristemske celice. To ni bilo pokazano pri nobeni matični celici vretenčarjev.

Trofoblast	Del blastociste, ki ne pripada embriu in se ugnezdi v maternično steno ter kasneje razvije v fetalni del placente.
Unipotentna celica	Tvori le eno celično linijo.
Usmerjenost	Vstop v program, ki vodi v diferenciacijo. Za matično celico to pomeni, da izstopi iz samoobnavljanja.
VSEL	Angl. Very Small Embryonic-like Stem Cells (zelo majhne celice podobne embrionalnim matičnim celicam). Odkrili so jih v kostnem mozgu odraslih miši in tudi v humani popkovnični krvi. Celice VSEL kažejo embrionalne lastnosti, <i>in vitro</i> so jih tudi diferencirali v tkiva, ki pripadajo vsem trem embrionalnim plastem.

1 UVOD

1.1 DEFINICIJA

V človekovem telesu se nahaja posebna vrsta celic, ki jo ohranjamo v sebi vse življenje in ki nam omogoča, da se naša tkiva in organi obnavljajo kljub številnim poškodbam in okvaram, do katerih prihaja v vsakdanjem življenju. Angleški izraz za to celico je »stem cell«, v slovenščini, pa se pojavlja več izrazov kot prevod angleškega termina, in sicer: matična celica, izvorna celica in zarodna celica. Večina avtorjev iz medicinskih krogov meni, da je najustreznejši izraz matična celica (MC), ker se kot tehnični termin uporablja v humani medicini že več kot trideset let, odkar uporabljajo presaditev krvotvornih matičnih celic za zdravljenje bolezni krvotvornih organov (Bohinjec, 1983).

MC so zelo redke. Največ jih je v kostnem mozgu (KM), pa še tam le okrog 1 na 10 000 odraslih diferenciranih celic. Še 100- do 1000-krat manj jih je v drugih odraslih tkivih. Sposobne so dolgotrajnega asimetričnega deljenja in tvorbe sebi identičnih kopij – samoobnavljanja – ter diferenciacije v bolj usmerjene tkivne celice. Pomembna lastnost MC je tudi plastičnost – sposobnost odraslih MC, da se diferencirajo tudi v celice drugih tkiv in ne samo v celice tkiva iz katerega izhajajo (preglednica 1) (Strbad in Rožman, 2005; Zipori, 2005).

Preglednica 1: Lastnosti MC (Oertel in Shafritz, 2008; Zipori, 2005):

Sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije	MC se samoobnavljajo z asimetrično celično delitvijo, pri kateri nastane dve hčerinski celici, od katerih ena ohrani lastnosti MC, druga pa se lahko diferencira v različne celične tipe (npr. srčne in mišične celice).
Potentnost	Sposobnost za diferenciacijo v različne vrste celic.
Plastičnost	Opažanje, da MC lahko razširijo svojo potentnost kot odgovor na fiziološke potrebe ali dražljaje. Pri tem se bodisi dediferencirajo ali transdiferencirajo (spremenijo iz ene vrste v drugo).

Pred skoraj tridesetimi leti so iz notranje celične mase mišjih blastocist izolirali embrionalne matične celice (EMC) (Evans in Kaufman, 1981; Martin, 1981), danes pa raziskave na področju MC – predvsem EMC in embrionalnim matičnim celicam podobnih celic – že zasedajo zelo pomembno mesto v medicini. V teh 27 letih se je nakopičilo ogromno znanja in izkušenj povezanih z EMC. Kljub vsem uspehom in odkritjem pa še vedno nismo dosegli tistega, kar je bil pravzaprav cilj vseh raziskav – praktične uporabe MC v regenerativni medicini.

1.2 ZGODOVINA RAZISKAV MATIČNIH CELIC

Danski raziskovalec Fabricious-Moeller je v tridesetih letih dvajsetega stoletja s poskusi na živalih odkril, da svinčena zaščita nog morskih prašičkov med obsevanjem celotnega telesa prepreči običajno zmanjšanje števila eritrocitov po obsevanju, s tem pa tudi ne pride do hemoragične diateze (Atkinson, 2004). To odkritje je bilo dolgo spregledano, ponovno so ga odkrili šele leta 1949 Jacobson in sodelavci, ki so poročali, da če mišim med obsevanjem zaščitimo vranico, ne pride do fatalne aplazije KM in smrti živali. Pokazali so

tudi, da lahko miši, obsevane z letalno dozo, pred smrtjo reši intraperitonealna injekcija vraničnih celic (Jacobson in sod., 1951). Že leta 1957 je Thomas s sodelavci poročal, da lahko človeku varno vbrizgamo večje količine KM (Thomas in sod., 1957). Leta 1961 sta Till in McCulloch v mišjem krvotvornem sistemu identificirala somatske MC (Till in McCulloch, 1961). Leto kasneje (1962) so dokazali nevrogenezo pri podganah (Altman, 1962), vendar tega odkritja znanstveni svet ni vzel preveč resno, ker je nasprotovalo dogmi, ki jo je leta 1888 postavil Cajal (De Carlos in Borrell, 2007), ki je trdil, da pri odraslih sesalcih ne nastajajo novi nevroni. McCulloch in Till sta leta 1963 pokazala prisotnost samoobnavljajočih se celic v mišjem KM (Siminovitch in sod., 1963).

Zanimanje za mišje pluripotentne MC se je začelo, ko so leta 1967 prvič izolirali MC iz teratokarcinomov. Teratokarcinomi so tumorji, ki jih sestavljajo celice, ki izvirajo iz vseh treh embrionalnih plasti, poleg teh pa je v njih tudi manjša skupina nediferenciranih celic, ki so podobne zgodnjim embrionalnim celicam. Poimenovali so jih embrionalne karcinomske celice (celice EC, angl. embryonal carcinoma cells). Celice EC se lahko v kokulturi z mitotsko inaktiviranimi fibroblasti neomejeno delijo. Sposobne so tudi diferenciacije v različne celične tipe. So maligne in sposobne obnoviti celoten tumor. Že transplantacija ene same celice EC v novega prejemnika zadostuje za nastanek novega tumorja. Vendar niso idealne celice za študij pluripotentnosti, ker izhajajo iz rakavih tumorjev in imajo aneuploiden kariotip (spremenjeno število kromosomov) (Andrews in sod., 2005; Friel in sod., 2005).

Za razvoj znanosti na področju MC so zelo pomembne raziskave in izkušnje s področja hematologije in presaditev KM. Po začetnih poskusih skupine dr. Thomasa v Seattlu v začetku šestdesetih let, pri katerih so bolniki z levkemijami preživeli le nekaj mesecev, je leta 1968 dr. Robert A. Good s sodelavci opravil prvo uspešno alogensko transplantacijo KM pri bolniku z dedno boleznijo SCID (angl. Severe Combined Immunodeficiency) (Gatti in sod., 1968). Leta 1978 so krvotvorne matične celice (KMC) odkrili tudi v humani popkovnični krvi. Istega leta je Schofield predlagal koncept niše MC, ki jo je definiral kot specifično anatomsko lokacijo kjer se celice zadržujejo in obnavljajo. Hkrati je to tudi okolje, ki preprečuje diferenciacijo. Ker gre za omejen prostor, se lahko v njem nahaja omejeno število celic. Niša omogoča tudi dediferenciacijo nekoliko bolj diferenciranih celic nazaj v MC (Schofield, 1978).

Novo poglavje v humani biologiji in medicini je bilo odkritje embrionalnih matičnih celic (EMC). Iz mišjih zarodkov sta jih prva izolirala Martin Evans in Matthew Kaufman leta 1981, istočasno pa jih je neodvisno izolirala tudi Gail R. Martin, ki je tudi prva uporabila izraz embrionalna matična celica (angl. embryonic stem cell) (Evans in Kaufman, 1981; Martin, 1981). Leta 1998 je James Thompson z Univerze v Wisconsin-Madisonu prvi izumil tehniko za izolacijo celic iz notranje celične mase (angl. Inner Cell Mass, ICM) humanih blastocist in razvil prve linije EMC (Thomson in sod., 1998). Tako pridobivanje EMC je povzročilo številne etične diskusije, saj je potrebno pri osamitvi EMC iz blastociste uničiti človeški zarodek. Etični zadržki so za več let upočasnili raziskave na tem področju, še posebno v ZDA. Kasneje se je izkazalo, da obstaja več načinov pridobivanja EMC, pri katerih ni potrebno uničiti človeškega zarodka. Istega leta je John Gearhart izoliral humane spolne MC iz fetalnih gonad (primordialne germinalne celice, PGC) in iz

njih razvil linijo pluripotentnih MC – germinalne matične celice (GMC) (Shamblott in sod., 1998) (preglednica 2).

Vzporedno s temi odkritji so raziskovalci ugotovili, da lahko z manipulacijo MC pridobijo najrazličnejše celične tipe vseh treh embrionalnih plasti.

Preglednica 2: Ključna odkritja na področju matičnih celic – pred letom 2000

1922	Francisco-Moeller izvaja študije uporabe KMC na živalih (Atkinson, 2004).
1949	Jacobson in sodelavci ponovno odkrijejo delo Francisca-Moellerja in poročajo, da če mišim med obsevanjem zaščitimo vranico, ne pride do fatalne aplazije KM in smrti živali (Jacobson in sod., 1951).
1951	Miši, obsevane z letalno dozo, pred smrtjo reši intraperitonealna injekcija vraničnih celic (Jacobson in sod., 1951).
1957	Thomas s sodelavci poroča, da lahko človeku varno vbrizgamo večje količine KM (Thomas in sod., 1957).
1961	V krvotvornem sistemu miši identificirajo somatske MC (Till in McCulloch, 1961).
1962	Joseph Altman in Gopal Das dokažeta nevrogenezo pri odraslih podganah (Altman, 1962).
1963	McCulloch in Till pokažeta prisotnost samoobnavljajočih se celic v mišjem KM (Siminovitch in sod., 1963).
1967	Prvič izolirajo MC iz teratokarcinomov (Andrews in sod., 2005; Friel in sod., 2005).
1968	Dr. Robert A. Good s presaditvijo KM med sorodnikoma uspešno ozdravi SCID (Gatti in sod., 1968).
1972	Prva transplantacija KMC iz popkovnične krvi (Ende in Ende, 1972).
1978	V humani popkovnični krvi potrdijo obstoj KMC.
1978	Schofield predlaga koncept niše MC (Schofield, 1978).
1981	Iz notranje celične mase mišjih blastocist Martin Evans, Matthew Kaufman in Gail R. Martin izolirajo embrionalne matične celice (Evans in Kaufman, 1981; Martin, 1981).
1988	Odkritje LIF (Leukemia inhibitory factor) omogoči prve kulture mišjih EMC brez uporabe hranilnih slojev (Friel in sod., 2005).
1995	Izolacija EMC primatov (Friel in sod., 2005).
1997	Pokažejo, da levkemija izvira iz KMC – prvi dokaz obstoja rakavih MC.
1998	James Thomson in sodelavci vzpostavijo prvo humano linijo EMC (Thomson in sod., 1998).
1998	John Gearhart izolira humane spolne MC iz fetalnih gonad in iz njih razvije linijo pluripotentnih MC (Shamblott in sod., 1998).

Leta 2003 je dr. Songtao Shi odkril MC v otroških zobeh (Miura in sod., 2003). Leta 2005 je prišlo do škandala, ko se je izkazalo, da je korejski znanstvenik Hwang Woo-Suk, ki je trdil, da mu je iz neoplojenih oocitov uspelo ustvariti več linij humanih EMC ponaredil podatke. Dva članka so objavili v reviji Science, ki pa so jih nato na začetku leta 2006, ko je postalo jasno, da je šlo za prevaro, umaknili (Hwang in sod., 2004; Hwang in sod., 2005). Leta 2005 so na univerzi v Newcastlu klonirali prvi človeški zarodek v Angliji (Stojkovic in sod., 2005). Oba dogodka sta zelo odmevala v medijih, naslovi povezani z MC so bili na prvih straneh vseh pomembnejših časopisov.

Leta 2005 so raziskovalci z univerze Kingston v Angliji objavili, da so našli nov tip MC, ki so jih poimenovali embrionalnim matičnim celicam podobne celice iz popkovnične krvi (angl. Cord-blood-derived Embryonic-like Stem Cell, CBE). Te celice imajo večjo potentnost in se lahko diferencirajo v več tipov celic kot MC pri odraslem. Zaradi svojih lastnosti ponujajo tudi velike možnosti uporabe v celičnih terapijah (McGuckin in sod., 2005).

EMC so edine MC, ki so dejansko pluripotentne in lahko tvorijo vsa tkiva vseh treh embrionalnih plasti. Zato so zelo zanimive kot možen izvor univerzalnih MC za zdravljenje. Celice, podobne embrionalnim, so opisali tudi v odraslih tkivih (Kucia in sod., 2006a; Kucia in sod., 2007b; Verfaillie, 2005), vendar je bilo to odkritje nekako podcenjeno.

Že leta 2006 je prišlo do odkritja, ki je močno razburkalo strokovno javnost. Znano je, da lahko jedro diferencirane somatske celice reprogramiramo na stanje podobno embrionalnemu, če ga prenesemo v izpraznjen oocit. Ta postopek imenujemo prenos jedra somatske celice (angl. Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT). Podobno se zgodi, če izvedemo fuzijo diferencirane celice in EMC. Zelo malo pa je znanega o faktorjih, ki so odgovorni za to reprogramiranje. Takahashi in Yamanaka sta uspela mišje odrasle fibroblaste spremeniti v pluripotentne celice. Reprogramiranje sta izvedla z vstavitvijo štirih genov (*Oct3/4*, *Sox-2*, *c-Myc* in *Klf*) v fibroblaste s pomočjo virusne transfekcije. Te celice sta poimenovala inducirane pluripotentne matične celice (celice iPS, Induced Pluripotent Stem Cells). Celice iPS kažejo lastnosti pluripotentnih MC (izražajo značilne označevalce, povzročajo teratome v golih miših, po injiciranju v blastocisto sodelujejo pri tvorbi tkiv zarodka) (Takahashi in Yamanaka, 2006). Leto kasneje, novembra 2007 poročajo, da so pridobili tudi humane celice iPS (Takahashi in sod., 2007; Yu in sod., 2007). To bi pomenilo, da je iz skoraj vsake človeške celice mogoče pridobiti MC, s čimer se izognemo uporabi zarodkov za te namene. Slabost pri njihovi metodi je bila uporaba gena *c-myc*, ki je kancerogen, še bolj pa retroviralni vnos genov, kar lahko kasneje pri bolniku privede do maligne alteracije presajenih celic. Letos, to je leta 2008, so pridobili celice iPS iz trebušnih in jetrnih celic odrasle miške z retrovirusnim vnosom genov. Te iPS celice so bolj podobne EMC kot tiste, ki so jih naredili do takrat in tudi niso tumorigene. Geni, ki so potrebni za reprogramiranje somatskih celic, so lahko v genom vstavljeni na ključnih mestih, zato za vstavitev genov lahko uporabimo nevirusne metode vnosa (Aoi in sod., 2008) (glej preglednico 3).

Preglednica 3: Ključna odkritja na področju matičnih celic – novejši dogodki

2000	Objavljenih več poročil o plastičnosti MC.
1999-2008	Celice, podobne embrionalnim, so opisali tudi v odraslih tkivih (Beltrami in sod., 2007; D'Ippolito in sod., 2004; D'Ippolito in sod., 2006; Kucia in sod., 2006a; Kucia in sod., 2007b; Kucia in sod., 2008b; McGuckin in sod., 2005; Ratajczak in sod., 2008b; Reyes in sod., 2001; Ribatti, 2007; Verfaillie, 2005; Virant-Klun in sod., 2008b).
2003	Dr. Songtao Shi odkrije nov vir matičnih celic odraslega v zobeh (Miura in sod., 2003).
2003	Uporaba Nanog in BMP v brezserumskih kulturah za gojenje EMC (Friel in sod., 2005).
2004-2005	Korejski znanstvenik Hwang Woo-Suk trdi, da mu je iz neoplojenih oocitov uspelo ustvariti več linij humanih EMC (Hwang in sod., 2004; Hwang in sod., 2005). Kasneje se izkaže, da je ponaredil podatke.
2005	Prvi kloniran humani zarodek v Angliji (Stojkovic in sod., 2005).
2005	Odkritje novega tipa MC. Celice so poimenovali embrionalim matičnim celicam podobne celice iz popkovnične krvi (angl. Cord-blood-derived Embryonic-like Stem Cell, CBE) (McGuckin in sod., 2005).
Avgust 2006	Izdelali inducirane pluripotentne matične (iPS) celice iz mišjih fibroblastov (Takahashi in Yamanaka, 2006).
Oktober 2006	V Angliji iz MC iz popkovnične krvi ustvarijo celice jeter.
2007	Skupina raziskovalcev pod vodstvom dr. Anthonyja Atale odkrije nov tip MC v amnijski tekočini. Te celice so morda odlična alternativa etično spornim EMC (De Coppi in sod., 2007).
Junij 2007	Tri različne skupine poročajo, da je mišje fibroblaste mogoče reprogramirati, da pridobijo embrionalne lastnosti (Cyranoski, 2007). Isti mesec znanstvenik Shoukhrat Mitalipov poroča o pridobitvi linije MC iz primatov z uporabo prenosa jedra somatske celice (SCNT, angl. somatic cell nuclear transfer) (Mitalipov in sod., 2007).
Oktober 2007	Mario Capecchi, Martin Evans in Oliver Smithies dobijo Nobelovo nagrado za medicino za delo na področju mišjih EMC – ukvarjali so se s »knock out« miškami za genetske raziskave (The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007).
November 2007	Izdelali humane celice iPS iz humanih fibroblastov (Takahashi in sod., 2007; Yu in sod., 2007).
Februar 2008	Pridobili celice iPS iz trebušnih in jetrnih celic odrasle miške. (Aoi in sod., 2008).

1.3 LASTNOSTI MATIČNIH CELIC

MC lahko razdelimo v dve skupini: embrionalne matične celice, ki se nahajajo v blastocisti (zarodku) in matične celice odraslega, ki se nahajajo v tkivih odraslega osebk. Nekateri avtorji navajajo še tretjo obliko MC in sicer fetalne MC, med katere sodijo tudi MC iz popkovnice in placente. Potentnost embrionalnih celic je zelo velika, saj se lahko razvijejo v vseh 200 različnih tipov celic, ki gradijo človeško telo, medtem ko so MC odraslega v svojem razvoju bolj omejene (Meng in sod., 2007).

Preglednica 4: MC imajo lahko različno stopnjo potentnosti (prirejeno po Ratajczak in sod., 2007a):

Totipotentne matične celice	Nastanejo pri združitvi spermija in jajčeca. Zigota in zgodnje blastomere (do stopnje blastociste) so totipotentne, saj se lahko diferencirajo v embrionalna in ekstraembrionalna tkiva. Iz vsake celice torej lahko nastane celoten zarodek (trofoblast in ICM).
Pluripotentne matične celice	Se lahko diferencirajo v tkiva, ki pripadajo vsem trem embrionalnim plastem (endoderm, mezoderm, ektoderm) ne pa v trofoblast, to je v del blastociste, ki se vgnezdí v steno maternice in se kasneje razvije v posteljico. Celične linije pluripotentnih celic lahko vzpostavimo iz celic znotrajcelične mase blastociste ali iz primordialnih germinalnih celic.
Multipotentne matične celice	Iz njih se lahko razvijejo celice, ki pripadajo le eni embrionalni plasti. Multipotentne celice se nahajajo v tkivih odraslega osebk, njihova naloga pa je obnavljati celice v tkivu in sodelovati v regeneraciji ob poškodbi. Primer multipotentnih MC so KMC pri katerih so opazili fenomen plastičnosti – zmožnost razvoja tudi v kardiomiocite.
Unipotentne matične celice	So tkivno specifične in se lahko razvijejo v samo eno celično linijo. Imajo pa sposobnost samoobnavljanja in le-ta jih loči od somatskih celic (npr. mišične matične celice).

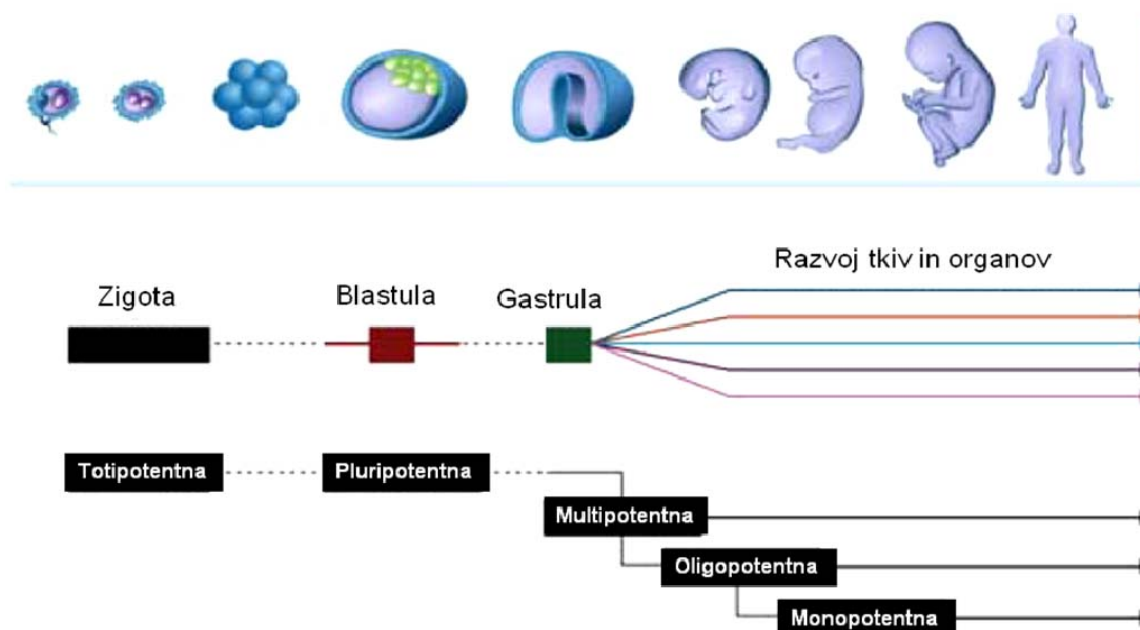
Edine dejansko pluripotentne MC, ki izhajajo iz notranje celične mase blastociste se imenujejo EMC. Iz njih izhajajo vse somatske matične celice (matične celice odraslega), ki se nato še naprej diferencirajo v multipotentne tkivno specifične MC. Iz multipotentnih tkivno specifičnih MC se razvijejo predniške celice, ki se delijo in končno diferencirajo v zrele somatske celice organov (preglednica 4) (Oertel in Shafritz, 2008). Razlike med odraslimi MC in EMC so številne. MC odraslega so multipotentne, v zelo majhnem številu se nahajajo v organih od koder jih je tudi težko izolirati. Prave celične linije odraslih MC ne obstajajo, tudi ni znano ali se *in vitro* ohranja normalen genetski profil celic. Ker izražajo nizko stopnjo telomerazne aktivnosti (telomeraza je encim, ki podaljšuje telomere, konce kromosomov), se jim s staranjem tudi krajšajo telomere in v kulturi dokaj hitro zapadejo v senescenco in odmrejo. Po transplantaciji ne predstavljajo nevarnosti nastanka teratomov. Pri EMC lahko za pridobivanje celic z željenim genotipom uporabimo metodo prenosa jedra, pri somatskih MC pa to ni mogoče. Zaradi svojega izvora iz tkiv odraslega človeka niso etično sporne in se uporabljajo v terapijah s transplantacijami. EMC se nahajajo v notranji celični masi blastociste, od koder jih lahko izoliramo in nato namnožimo v kulturi v velikem številu. Zaradi uničenja blastociste pri izolaciji so etično sporne. V terapiji se še ne uporabljajo, ker lahko po transplantaciji povzročijo nastanek tumorjev. EMC se lahko uporabljajo za testiranje farmacevtskih substanc, za razvojne

študije, za študij kongenitalnih anomalij in raka pri otrocih ter za produkcijo gamet in embrijev. EMC so pluripotentne, izražajo telomero zato se jim med delitvijo ohranja dolžina telomera. V kulturi lahko preživijo zelo dolgo časa in ohranjajo normalen kariotip, na voljo so tudi celične linije (preglednica 5) (Bongso in Richards, 2004).

Preglednica 5: Razlike med hMC odraslega in hEMC (Bongso in Richards, 2004)

hMC odraslega	hEMC
MC se nahajajo v organih v zelo majhnem številu, težko jih je izolirati	Nahajajo se v notranji celični masi blastociste. Ko jih imamo izolirane, jih lahko namnožimo v velikem številu
Celične linije ne obstajajo	Na voljo so celične linije, enostaven »scale-up« (povečevanje)
Multipotentne	Pluripotentne
Ni znano ali <i>in vitro</i> ohranjajo normalen genetski profil	Normalen kariotip ohranjajo tudi skozi veliko število pasaž
Nizka stopnja izražanja telomerase	Visoka stopnja izražanja telomerase, neomejeno samoobnavljanje celic
S staranjem se jim krajšajo telomere	Telomere se ne krajšajo
Zgodnja apoptoza	Pozna apoptoza
Ni mogoče pridobivati MC in diferenciranih tkiv z zaželenim genotipom	Možno z uporabo metode SCNT
Ni nevarnosti nastanka teratomov po transplantaciji.	Po transplantaciji nevarnost tvorbe teratomov
Težko je spremeniti epigenetski profil celic.	Epigenetske spremembe so reverzibilne
Niso etično sporne	Etično sporne (različna zakonodaja v različnih državah)
Uporaba: terapije s transplantacijo	Uporaba: 1) terapije s transplantacijo; 2) testiranje farmacevtskih substanc; 3) produkcija gamet in embrijev; 4) študije človeškega razvoja, kongenitalnih anomalij in raka pri otrocih.
Plastičnost je le delna; opisujejo primere transdiferenciacije MMC in KMC	Popolna plastičnost

Po prevladujoči teoriji vsako tkivo vsebuje majhno populacijo MC, ki imajo sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije. Razvoj MC je enosmeren. Z diferenciacijo v zrele celice se zmanjšuje pluripotentnost celice (slika 1). Mnoge študije so pokazale, da imajo odrasle MC sposobnost diferenciacije tudi v celice drugih tkiv in ne samo v celice tkiva iz katerega izhajajo. To sposobnost imenujemo plastičnost MC.



Slika 1: V različnih razvojnih stopnjah v razvoju osebkca se nahajajo MC z različnim razvojnim potencialom. Po trenutno prevladujoči teoriji se s staranjem osebkca zmanjšuje potentnost MC (Zipori, 2005).

MC lahko gojimo *in vitro* in jih s pomočjo rastnih dejavnikov tudi usmerimo v diferenciacijo v različne specializirane tipe celic, npr. mišične, jetrne ali živčne celice. Zato si moderna medicina veliko obeta od uporabe MC v regenerativne namene. V ta namen so najbolj uporabne avtologne celice, ki jih lahko pridobimo iz popkovnične krvi, KM ali pa s terapevtskim kloniranjem. Pri tem s prenosom somatskega jedra in izpraznjenjem oocit najprej ustvarimo blastocisto, ki je genetsko identična osebkcu in nato iz nje izoliramo EMC za zdravljenje. Kot že omenjeno, je ta način etično zelo sporen, saj ustvarjamo zarodke z namenom, da jih bomo uničili, zato iščejo alternativne načine za pridobivanje ustreznih MC za zdravljenje.

V zadnjem času se pojavlja vedno več objav v katerih avtorji trdijo, da so v različnih tkivih odraslega človeka našli še tretjo skupino MC – populacijo MC z embrionalnim značajem (McGuckin in sod., 2005; Ratajczak in sod., 2008a; Ratajczak in sod., 2008b; Virant-Klun in sod., 2008b). Te celice bi lahko predstavljale odlično alternativo EMC za uporabo v regenerativni medicini, saj njihovo pridobivanje ni etično sporno. Vendar jih je v odraslih tkivih izjemno malo, tako da je njihovo pridobivanje in razmnoževanje tehnično zelo zahtevno.

V našem delu se nameravamo posvetiti ravno tej zadnji skupini matičnih celic pri človeku, saj menimo, da bi dokaz njihovega dejanskega obstoja omogočil nadaljne raziskave, s katerimi bodo te celice lahko postale široko uporabne v medicini, ne da bi pri tem prihajalo do etičnih ali drugačnih problemov pri njihovem pridobivanju in uporabi.

2 PREGLED OBJAV

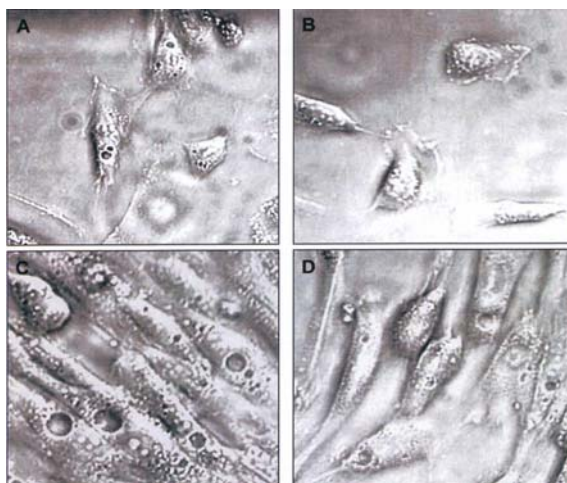
2.1 RAZLIČNI TIPI PLURIPOTENTNIH MATIČNIH CELIC PRI ODRASLEM

2.1.1 Multipotentne prednice odraslega (MAPC)

Multipotentne prednice odraslega ali MAPC (angl. Multipotent Adult Progenitor Cells) so MC, ki imajo potencial za diferenciacijo podoben EMC – lahko tvorijo vse embrionalne plasti (mezoderm, endoderm, ektoderm).

Celice MAPC so odkrili leta 2001, ko sta Reyes in Verfailliejeva poskušala izolirati mezenhimske MC iz humanega KM. Uporabila sta nekoliko modificirane pogoje in pokazala, da lahko iz KM izoliramo celice s sposobnostjo samoobnavljanja in diferenciacije v različne linije. Celice MAPC je mogoče izolirati iz KM, pa tudi iz možgan in skeletnih mišic (Jiang in sod., 2002). Analiza transkripcijskega profila celic iz teh treh različnih virov z mikročipi je pokazala, da imajo zelo podoben profil izražanja genov. Humane celice MAPC ohranjajo normalno dolžino telomer skozi več kot 80 podvojitvev, mišje pa celo skozi več kot 120 podvojitvev. Tako humane kot mišje celice MAPC izražajo telomerozo, ki je potrebna za ohranjanje dolžine telomer in pa transkripcijska faktorja Oct-4 in Rex-1, ki sta značilna za EMC. Celice MAPC so CD34-, c-kit- (CD117-), CD45-, MHC-I- in MHC-II-negativne in Flk1- (VEGFR2), Sca1-, CD44-, CD13- in Thy-1- (CD90-)-pozitivne. Mišje MAPC izražajo tudi antigen SSEA1 (angl. Stage Specific Embryonic Antigen-1), ki ga ponavadi povezujemo z EMC (Reyes in sod., 2001, 2005; Schwartz in Verfaillie, 2005; Serafini in sod., 2007).

Celice MAPC torej za rast v kulturi potrebujejo pogoje podobne pogojem za gojenje EMC, izražajo nekaj genetskih markerjev značilnih za EMC (Oct-4, Rex1, SSEA-1), imajo velik proliferativni potencial, se lahko diferencirajo v vse tri embrionalne plasti, če jih injiciramo v blastocisto, prispevajo k razvoju vseh organom. Če nanje delujejo signali iz določenega tkiva, se razvijejo v celice tega tkiva (Schwartz in Verfaillie, 2005).

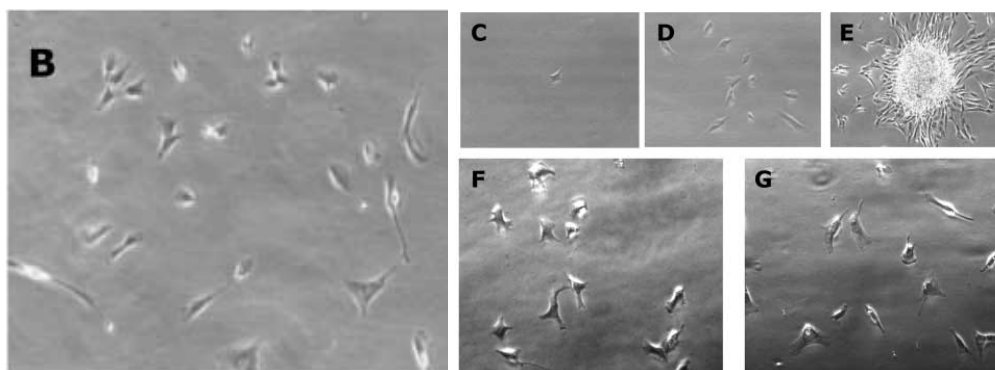


Slika 2: Celice MAPC v kulturi. Po 15-ih (A) in 53-ih (B) podvojitvah, gostoto celic so vzdrževali med 2000 in 8000 celic/cm². Celice MAPC gojene pri 10-odstotnem zarodni telečji serum (FBS) (C) in pri gostoti večji od 10 000 celic/cm² (D) (Reyes in sod., 2001).

2.1.2 Celice MIAMI

Celice MIAMI (angl. Marrow-isolated Adult Multilineage Inducible Cells) so prvič izolirali leta 2004 iz humanega KM. Izolirali so jih s posebnimi pogoji gojenja: EMC substrat, nižji parcialni tlak kisika, dodatek rastnih faktorjev in vitaminov, ustrezna gostota celic in kokultura z drugimi celicami. Z vsemi temi pogoji so poskušali čim bolj posnemati pogoje niše (mikrookolja), v kateri so pričakovali, da se primitivne celice nahajajo. Pred izolacijo niso izvedli nobene frakcionacije KM, ker so predpostavili, da bi s frakcionacijo uničili nišo, v kateri se MC nahajajo. To populacijo celic so izolirali iz različno starih prostovoljcev (3 – 72 let). Celice MIAMI so adherentne, velike so od 7-10 μm , imajo malo citoplazme in se hitro delijo. Morfologija celic ostaja enaka tudi po 52 podvojitvah (slika 3). *In vitro* so se celice MIAMI sposobne diferencirati v vse tri embrionalne plasti – v osteoblaste, adipocite, neuralne celice, in celice, ki so izražale označevalce pankreatičnih otočkov. Nediferencirane celice imajo veliko potentnost in izražajo označevalce, značilne za EMC kot tudi za linije, ki izhajajo iz mezoderma, ektoderma in endoderma (D'Ippolito in sod., 2004).

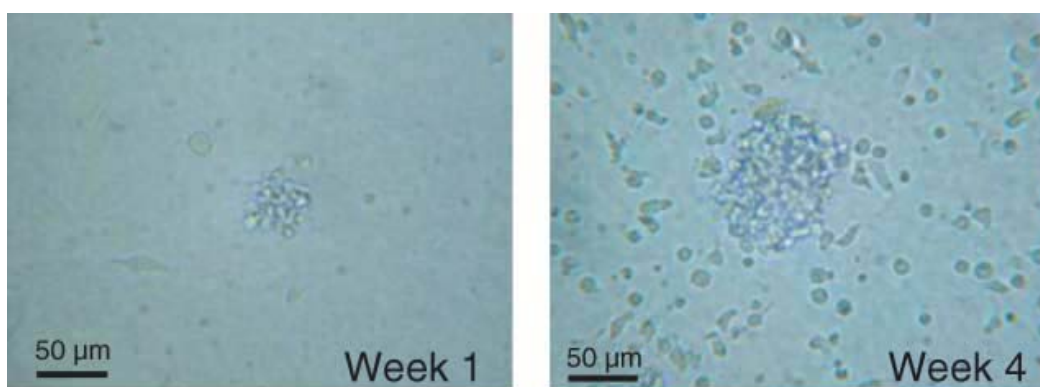
Celice MIAMI so pozitivne za naslednjo kombinacijo označevalcev: CD29, CD49e, CD63, CD81, CD90, CD122, CD164, c-Met, NTRK3, BMP-receptor 1b, Oct3/4 in SSEA-4, negativne pa so za: CD36, ICAM-1 (CD54), N-CAM (CD56), CD109, CD34, CD45, CD117 in HLA-I ter HLA-II. Vse kolonije celic MIAMI so izražale telomerozo. Avtorji kot kombinacijo označevalcev za izolacijo celic MIAMI predlagajo vse zgoraj naštetе pozitivne označevalce (D'Ippolito in sod., 2006).



Slika 3: Celice MIAMI. (B) Celice MIAMI so velike od 7-10 μm , imajo malo citoplazme in se hitro delijo. Celice MIAMI nasajene pri nizki gostoti (0.1-0.2 celic/ cm^2) (C) so pustili, da so se namnožile (D) in dosegle velikost 50-100 celic (E). Nato so kolonije izolirali in zopet nasadili pri nizki gostoti celic. Morfologija celic ostaja enaka po 5 podvojitvah (F) in po 52 podvojitvah (G). Velja opozoriti na obliko teh celic, ki ni okrogla! (B,F,G) 20 $\times$ povečava; (C-E) 10 $\times$ povečava (D'Ippolito in sod., 2004).

2.1.3 Embrionalnim matičnim celicam podobne celice iz popkovnične krvi

Popkovnična kri predstavlja še en pomemben vir MC odraslega, saj je v svetovnem merilu 100 milijonov rojstev letno in pri večini se popkovnična kri zavrže, MC pa tako ostanejo neizkoriščene. Volumen popkovnične krvi je omejen in v njem se nahaja omejeno število celic. Zato se išče načine za varno *ex vivo* pomnoževanje MC iz popkovnične krvi. Leta 2005 so angleški avtorji v popkovnični krvi odkrili EMC podobne celice (CBE, angl. cord-blood-derived embryonic-like stem cells), ki se lahko razvijejo v kri, pa tudi v nehematopoetska tkiva (npr. hepatocite). Celice CBE izražajo embrionalne označevalce Oct-4, SSEA-4 in SSEA-3 ter TRA-1-60 in TRA-1-81 in so negativne za nehumani označevalec SSEA-1. V kulturi se pritrdijo na podlago. *In vitro* jih lahko v nediferenciranem stanju ohranjamo več kot 13 tednov. Celice v kulturi rastejo v skupkih, ki so podobni embrioidnim telescem (McGuckin in sod., 2005).



Slika 4: Embrionalnim matičnim celicam podobne celice iz popkovnične krvi. Po enem tednu gojenja so se nahajale v kolonijah. Izgledajo drugače kot celice VSEL (McGuckin in sod., 2005).

2.1.4 Celice hMASC

Celice hMASC (angl. Human Multipotent Adult Stem Cells) so izolirali iz različnih tkiv odraslega: KM, jeter in srca. Celice iz vseh treh tkiv so izražale gene, značilne za pluripotentne celice Oct-4, Nanog in Rex1, kazale pa so tudi telomerazno aktivnost. Tudi celice hMASC imajo širok diferenciacijski potencial, kar so pokazali tako na morfološki kot tudi na funkcionalni ravni. In sicer so celice diferencirali v neuroektoderm, mezoderm (kost in mišice) in endoderm (jetra). Celice iz vseh treh različnih tkiv so imele zelo podoben ekspresijski profil, ki so ga preverjali z mikromrežami. Opazili so, da so bile transkripcijsko aktivne predvsem celične poti, ki regulirajo samoobnavljanje MC – poti, ki vključujejo Wnt, Hedgehog in Notch. Podoben ekspresijski profil celic, ki so izvirale iz različnih tkiv so opazili tudi pri genih, pomembnih za vzdrževanje nediferenciranega stanja, aktivno ekspresijo genov za citokine in rastne faktorje, ter visoko ekspresijo proteinov matriksa in adhezijskih molekul (Beltrami in sod., 2007).

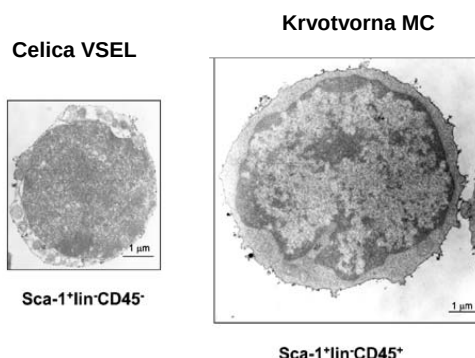
2.1.5 Celice VSEL

KM vsebuje populacijo KMC iz katerih nastanejo krvne celice. Koncept plastičnosti KMC in torej njihove sposobnosti transdiferenciacije v matične/predniške celice nehematopoetskih tkiv, je zelo kontroverzen. Na začetku so najprej pokazali velik regenerativni potencial matičnih celic iz KM pri zdravljenju srčne kapi in poškodb jeter, ki so ga pripisali plastičnosti KMC. Kasneje pa se je izkazalo, da lahko prispevek matičnih celic iz KM k regeneraciji tkiv in organov razložimo s heterogeno populacijo matičnih celic v samem KM in ne z njihovo plastičnostjo. Ratajczak in njegova skupina je v KM odraslih miši in tudi v humani popkovnični krvi našla populacijo zelo majhnih MC z embrionalnimi lastnostmi (celice VSEL, angl. Very Small Embryonic-like Stem Cells). Predpostavljajo, da se te celice v KM odložijo že med zgodnjo ontogenezo, ob poškodbi tkiv pa se mobilizirajo v periferni krvni obtok in sodelujejo pri regeneraciji poškodovanih organov oziroma tkiv. Mobilizacija teh celic ob nepravem času in njihovo zasidranje na neprava mesta pa ima lahko za posledico nastanek tumorjev (Kucia in sod., 2006b).

Ratajczak in njegova skupina se večinoma ukvarja z mišjimi celicami VSEL (Dawn in sod., 2008; Kucia in sod., 2006a, 2006b, 2008b), le nekaj eksperimentov so opravili s humanimi celicami VSEL, in sicer so jih odkrili v humani popkovnični krvi (Kucia in sod., 2007a, 2007, 2007b). V zadnjih letih so torej različne raziskovalne skupine odkrile več vrst MC pri odraslih, ki imajo embrionalne lastnosti. Vsaka skupina jim je dala svoje ime.

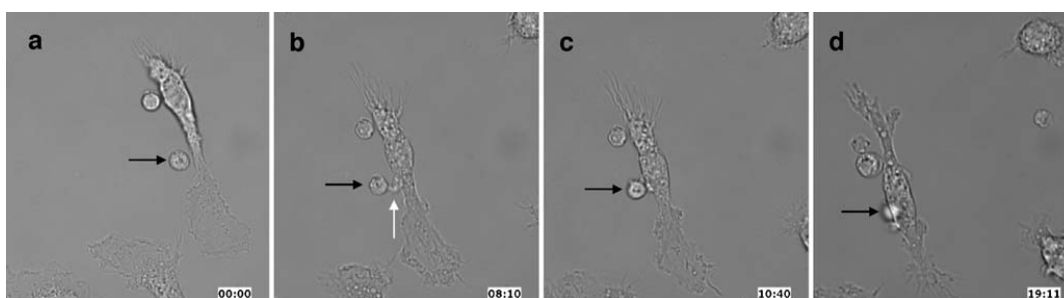
2.1.5.1 Mišje celice VSEL

Lastnosti mišjih celic VSEL kot jih opisujejo avtorji so naslednje: celice so velike od 2-4 μm , imajo veliko jedro, ki ga obdaja le ozek pas citoplazme. V jedru se nahaja evkromatin, ki je drugače značilen za EMC. Ugotovili so tudi, da so celice VSEL v KM prisotne v majhnem številu, in da njihovo število upada s staranjem živali, kar se ujema z ugotovitvami, da je regeneracija v mladih živalih hitrejša. Pokazali so, da so celice VSEL zelo mobilne in se odzivajo na gradient SDF-1 (poškodovano tkivo izloča razne kemoatraktante – poleg SDF-1 tudi VEGF, HGF/SF, LIF in FGF-2) potujejo namreč proti višji koncentraciji SDF-1, ter se pritrdijo na fibroblaste (slika 6), ki izhajajo iz KM. Fibroblasti izločajo SDF-1 in druge kemoatraktante, zato je možno, da ustvarjajo neke vrste nišo v kateri se nahajajo celice VSEL. Zaradi povezave med fibroblasti iz KM in celicami VSEL so izolirane stromalne celice iz KM verjetno že od začetka kontaminirane s populacijo celic VSEL. Avtorji predpostavljajo, da se podobne celice nahajajo tudi v drugih tkivih. Celice VSEL imajo velik razvojni potencial in so se sposobne diferencirati v tkiva, ki pripadajo vsem trem embrionalnim plastem (ektoderm – neuroni, mezoderm – kardiomiociti, endoderm – celice otočkov trebušne slinavke) (Kucia in sod., 2006a).



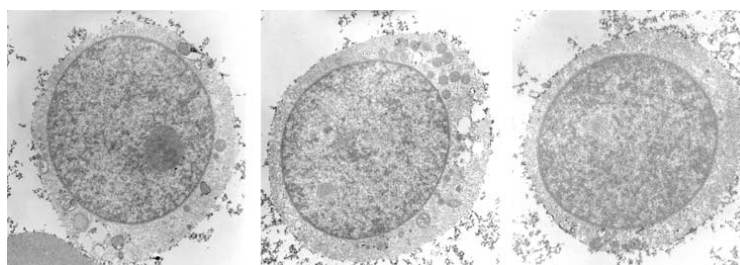
Slika 5: Mišje Sca-1⁺lin⁻CD45⁻ matične celice VSEL in mišje Sca-1⁺lin⁻CD45⁺ KMC (TEM) (Kucia in sod., 2006b).

Mišje celice VSEL izražajo naslednje označevalce: Oct-4, Rex1, Nanog, Dppa3, CXCR4 in Telomerazni protein Rif1. Dokazali pa so tudi, da so pozitivne za nekatere označevalce pluripotentnosti tudi na ravni proteinov: SSEA-1, Oct-4 in Nanog, ne izražajo pa MHC-I in HLA-DR antigenov in so CD90, CD105 in CD29 negativne (Kucia in sod., 2006b, 2008a; Ratajczak in sod., 2007a).



Slika 6: Celice VSEL so pritrjene na fibroblaste iz KM. Med celicami VSEL in fibroblasti prihaja do interakcij. Fotografije so posnete v razmakih 20 minut. (a) VSEL celica se približa/pritrđi na fibroblast (puščica). (b) Fibroblast z neke vrste podaljškom ujame celico VSEL (bela puščica). (c, d) Fibroblastni podaljšek povleče celico bliže in jo namesti pod fibroblast. Zaradi opazovanj dokumentiranih na zgornji sliki avtorji svetujejo, da je pri eksperimentih s transdiferenciacijo potrebno izključiti možnost kontaminacije preučevane celične populacije s celicami VSEL (Kucia in sod., 2008b).

2.1.5.2 Humane celice VSEL

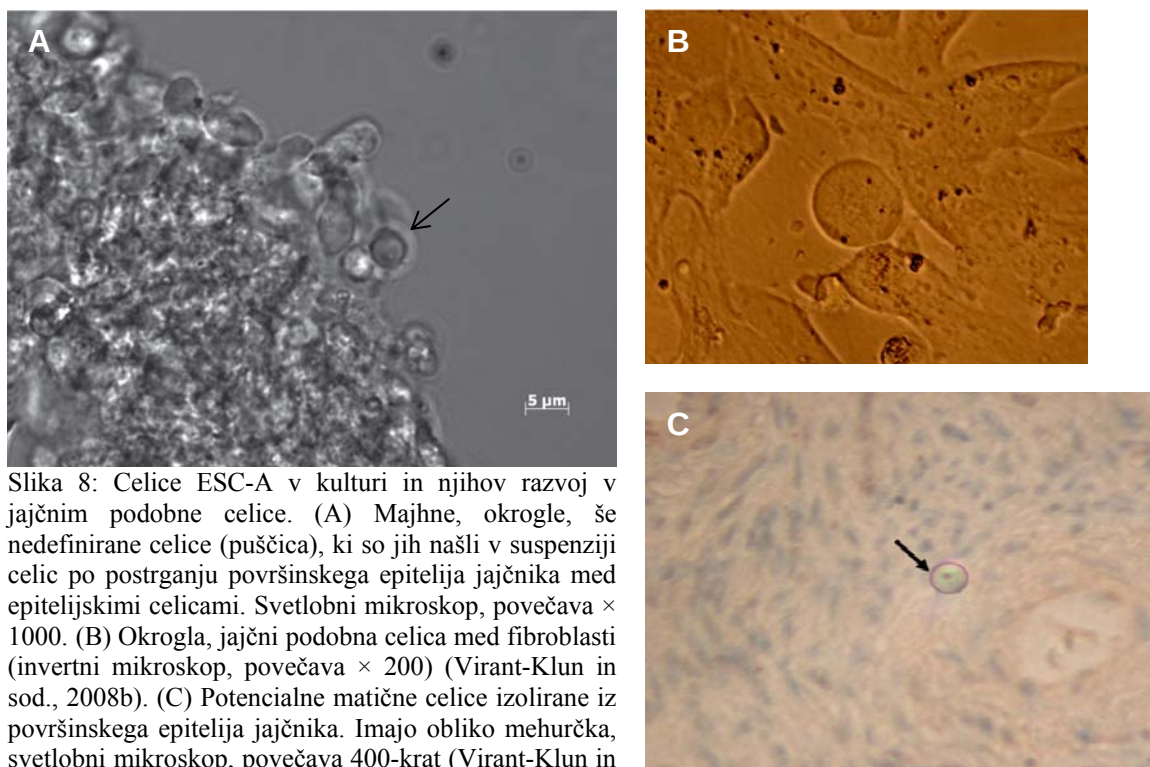


Slika 7: Transmisijška elektronska mikroskopija: CXCR4⁺ lin⁻ CD45⁻ celice iz humane popkovnične krvi. Premer celic je 3-5 µm, imajo veliko jedro in tanek obod citoplazme, ki vsebuje nekaj mitohondrijev, ribosomov, veziklov in endoplazemski retikulum. Kromatin je v obliki evkromatina (Kucia in sod., 2007a).

Pri človeku so celice VSEL izolirali iz popkovnične krvi. Poimenovali so jih CB-VSEL. Verjetno je prisotnost celic VSEL v popkovnični krvi tista, ki je odgovorna za pozitivne učinke na regeneracijo tkiv po infuziji celic iz popkovnične krvi. Lastnosti humanih celic VSEL so enake kot pri mišjih: zopet so to zelo majhne celice velike od 3-5 μm , imajo veliko jedro z evkromatinom in ozek obod citoplazme. Izražajo Oct-4 in Nanog ter antigen SSEA-4 (Kucia in sod., 2007a).

2.1.6 Embrionalne matične celice odraslega

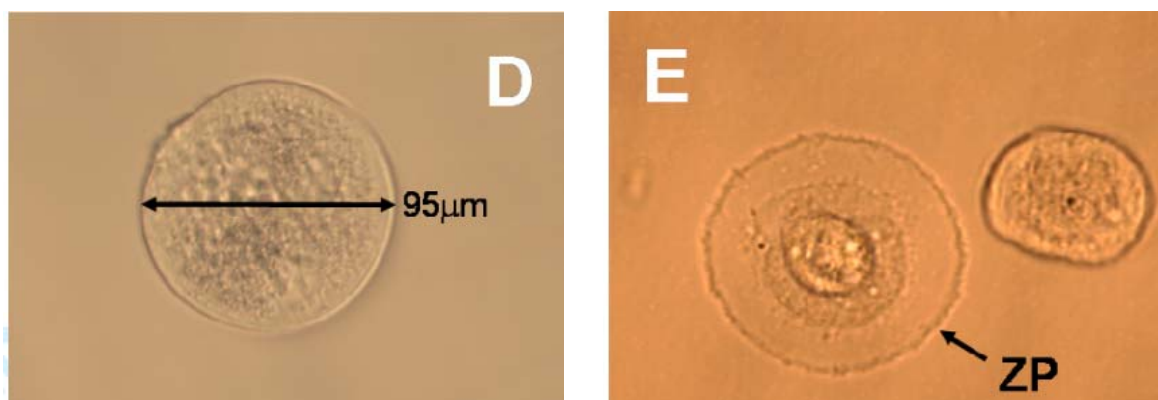
V medicini še vedno velja dogma, da je število foliklov in jajčnih celic ob rojstvu deklice dokončno in da vsak menstruacijski cikel dozori en folikel in ena jajčna celica iz obstoječe zaloge. Vse več pa je eksperimentalnih dokazov, da to najbrž ne velja. V površinskem epiteliju jajčnika so prisotne nediferencirane matične celice, ki se lahko tudi v odraslem obdobju življenja v jajčniku diferencirajo v folikel in jajčne celice. V tej raziskavi so avtorji osamili matične celice iz površinskega epitelija jajčnika in jih poskušali diferencirati v jajčne celice *in vitro*. Darovalke celic so bile ženske, ki niso imele naravno prisotnih foliklov in jajčnih celic v skorji jajčnika (ženske po menopavzi in ženske s prezgodnjo menopavzo) (Virant-Klun in sod., 2008a).



Slika 8: Celice ESC-A v kulturi in njihov razvoj v jajčnim podobne celice. (A) Majhne, okrogle, še nedefinirane celice (puščica), ki so jih našli v suspenziji celic po postrganju površinskega epitelija jajčnika med epitelijskimi celicami. Svetlobni mikroskop, povečava $\times 1000$. (B) Okrogla, jajčni podobna celica med fibroblasti (invertni mikroskop, povečava $\times 200$) (Virant-Klun in sod., 2008b). (C) Potencialne matične celice izolirane iz površinskega epitelija jajčnika. Imajo obliko mehurčka, svetlobni mikroskop, povečava 400-krat (Virant-Klun in sod., 2008a).

Pri vseh ženskah so iz površinskega epitelija jajčnika uspešno osamili potencialne matične celice, ki so bile pozitivne za označevalce embrionalnih matičnih celic – Oct-4, Sox-2, Nanog in za površinski antigen SSEA-4. Embrionalne matične celice odraslega (angl. Embryonic-like Stem cell of the Adult, ESC-A) so majhne (2-4 μm) z vakuolo, okrogle oblike in rumenkaste barve (slika 8C). Opazili so, da so pritrjene na fibroblaste oz. so v

kontakta z njimi. Iz celic so nato vzpostavili celično kulturo jajčnika, v kateri so se na približno 5. dan gojenja razvile jajčnim celicam podobne celice, pozitivne za transkripcijski označevalec Oct-4 in za imunohistokemične označevalce jajčnih celic – c-kit, Oct-4, ZP2, DAZL in celo za mejotski označevalec SCP3. Pretočna citometrija je potrdila prisotnost haploidnih celic (ti. spolnih celic, ki nastanejo z mejozo) v celični kulturi jajčnika pomenopavznih žensk. Po 20 dneh gojenja so jajčnim celicam podobne celice dosegle velikost do 95 μm . Nekatere med njimi so izražale strukture podobne *zoni pellucidi* (slika 9E). Opazili so tudi strukture podobne polarnemu telescu in germinalnemu veziklu. V enakem času kot oocitom podobne celice, so se v kulturi razvile tudi blastocistam podobne strukture, ki so presegle velikost 100 μm in niso bile pritrjene na dno gojilne posodice. Pri nekaterih so celo opazili strukture podobne embrioblastu in trofoektodermu. Iz matičnih celic so se razvili tudi nekateri somatski tipi celic – fibroblasti, nevronom podobne celice in mioblastom podobne celice. Pri ženskah s prezgodnjo menopavzo so se jajčnim podobne celice razvile samo ob prisotnosti folikularne tekočine, ne pa ob prisotnosti telečjega seruma (Virant-Klun in sod., 2008a, 2008b).



Slika 9: Oocitom podobne celice, ki naj bi se razvile iz celic ESC-A. (D) Oocitu podobna celica s premerom 95 μm , (E) in oocitu podobna celica s strukturo podobno *zoni pellucidi* (puščica); invertni mikroskop, povečava 400-krat (Virant-Klun in sod., 2008a)

Oocitom podobne celice so se razvile v tesnem kontaktu s fibroblasti v mediju, ki je vseboval fenol rdeče (šibka estrogenska aktivnost). Znano je, da fibroblasti izražajo aromatazo, ki katalizira pretvorbo C(19) steroidov v estrogene in s tem podpira razvoj oocitom podobnih celic. Prav tako fibroblasti izločajo tudi fibroblastni rastni faktor (FGF) (Virant-Klun in sod. 2008a, 2008b).

V površinskem epiteliju jajčnika so torej prisotne potencialne matične celice embrionalnega značaja, ki se v pogojih *in vitro* lahko razvijejo v jajčnim podobne celice in druge tipe celic. Te jajčnim podobne celice lahko pod določenimi pogoji tvorijo tudi blastociste, kar pomeni, da pride do partenogenetskega razvoja zarodka (Virant-Klun in sod., 2008a, 2008b).

2.1.7 Povzetek značilnosti pluripotentnih matičnih celic pri odraslem

Težko je pripraviti zanesljiv in verodostojen povzetek označevalcev MC iz KM. Različni avtorji namreč navajajo različne označevalce, značilne za določen tip celic. Poleg tega je zelo verjetno, da obstajajo še drugi, še neodkriti označevalci, ki so bolj specifični za posamezen tip celic. Zaradi neidealnih metod selekcije celic, pa je možno tudi, da so imeli raziskovalci za testiranje označevalcev že na začetku heterogeno populacijo celic.

Že Ratajczak (Ratajczak in sod., 2007b) je izrazil hipotezo, da je mogoče, da opisane populacije MC iz KM predstavljajo podobne in prekrivajoče populacije MC, o katerih pa so poročali kot o ločenih populacijah, saj so jih odkrili z različnimi eksperimentalnimi pristopi in jim zato tudi pripisali različne lastnosti in različna imena.

Preglednica 6: Matične celice iz kostnega mozga – povzetek označevalcev.

	MAPC (1)	MIAMI (2)	CBE (3)	hMASC (4)	VSEL (miš) (5)	VSEL (človek) (6)	ESC-A (7)
Velikost	NA	7-10 µm	NA	NA	2-4 µm	3-5 µm	2-4 µm
Oblika	Fibroblastne oblike	Fibroblastne ali razraščene oblike	NA	NA	Okrogle	Okrogle	Okrogle z vakuolo
Tkivo iz katerega so jih izolirali	KM, možgani, mišice	KM	Popkovnična kri	KM, jetra, srce	KM	Popkovnična kri	Površinski epitelij jajčnikov, KM
Diferenciacijski potencial	mezo-endo-ektoderm	mezo-endo-ektoderm	Kri in hepatociti	mezo-endo-ektoderm	mezo-endo-ektoderm	NA	Na
Morfologija	Normalna dolžina telomer skozi 80 podvojitev	Morfologija enaka po 52-ih ponovitvah	Ohranjanje v kulturi v nediferenciranem stanju več kot 13 tednov	NA	Veliko jedro, malo citoplazme, eukromatin	Veliko jedro, malo citoplazme, eukromatin	Rumenkaste barve
Telomeraza	DA	DA	NA	DA	DA	NA	NA
Geni značilni za pluripotentnost	Oct4 Nanog-neg Rex-1	Oct3/4 SSEA-4	Oct-4 SSEA-4, SSEA-3 TRA-1-60 TRA-1-81	Oct-4 Rex1 Nanog	Oct-4 Rex1 Nanog Dppa3 SSEA-1	Oct-4 Nanog SSEA-4	Oct-4, Nanog SSEA-4 Sox-2
Pozitivni označevalci	CD13 CD44 CD49b CD90 (Thy-1) CD133 (AC133) c-kit (CD177) Flk1 (VEGFR2)	CD29 CD49e CD63 CD81 CD90 (Thy-1) CD122 CD164 c-Met	NA	NA	CD184 (CXCR4) Sca1 c-Met LIF-R	CD34 CD133 (AC133) CD184 (CXCR4)	NA

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

	MAPC (1)	MIAMI (2)	CBE (3)	hMASC (4)	VSEL (miš) (5)	VSEL (človek) (6)	ESC-A (7)
	Sca1 B2- mikroglobulin	NTRK3 BMP-receptor 1b					
Negativni označevalci	CD34 CD45 CD45 c-kit (CD117) MHC-I MHC-II	CD34 CD36 CD45 ICAM-1 (CD54) N-CAM (CD56) CD109 c-kit (CD117) HLA-I HLA-II	NA	NA	CD29 CD45 CD90 (Thy-1) CD105 MHC-I MHC-II Lin	CD45 Lin	NA

Legenda:

NA – podatek ni znan

Legenda virov v zgornji tabeli:

- (1) (Reyes in sod., 2001; Schwartz in Verfaillie, 2005)
- (2) (D'Ippolito in sod., 2004; D'Ippolito in sod., 2006)
- (3) (McGuckin in sod., 2005)
- (4) (Beltrami in sod., 2007)
- (5) (Kucia in sod., 2006a; Ratajczak in sod., 2007b)
- (6) (Kucia in sod., 2007; Ratajczak in sod., 2007b)
- (7) (Virant-Klun in sod., 2008a; Virant-Klun in sod., 2008b)

2.2 MATIČNE CELICE Z VPRAŠLJIVO PLURIPOTENTNOSTJO

2.2.1 Krvotvorne matične celice

Vse krvne celice nastajajo pri človeku iz KMC v krvotvornem tkivu. To je pri odraslem človeku rdeči kostni mozeg, ki se nahaja v vretencih, rebrih, lobanji, medenici in v cevastih dolgih kosteh. KMC v kostnem mozgu so redke in preko krvi počasi krožijo po našem telesu. Njihova pogostost v kostnem mozgu je okrog 1 – 1,5 na 10 000 vseh celic, v periferni krvi celo 1 na 100.000 vseh krvnih celic. Organizirane so v kompleksno razvojno hierarhijo. Med seboj se ločijo po potentnosti in številnih površinskih označevalcih - CD (angl. Clusters of Differentiation). Najbolj primitivne KMC imajo določene pluripotentne značilnosti. Zrelejše oblike so sicer sposobne tako samoobnavljanja kot tudi dozorevanja v usmerjene krvne celice, zmanjšana je le njihova sposobnost plastičnosti. Te se po več zaporednih delitvah in dozorevanju razvijejo v zrele krvne celice, ki nato izplavajo v kri (Strbad, 2004).

KMC izražajo specifične površinske antigene. CD34 so dolgo časa navajali kot edini označevalec za obogatitev pluripotentnih KMC in njihovih bolj zrelih potomcev. V zadnjem času pa so pri miših in ljudeh našli med KMC poleg CD34-poz tudi celice CD34-neg. Nobena od teh populacij ne izraža antigenov, prisotnih na zrelih krvnih celicah. Dokazano je bilo, da celice CD34-poz lahko prehajajo v CD34-neg in obratno. V kulturi CD34-neg celice pridobijo antigen CD34-poz, zato domnevajo, da so celice CD34-neg bolj primitivne od CD34-poz, označevalec CD34-poz pa je verjetno aktivacijski antigen, ki vodi v diferenciacijo KMC. Na človeških KMC so našli tudi antigen AC133 (CD133), ki je skupen obema prej omenjenima podsetoma celic CD34 in številne druge antigene. KMC so pozitivne tudi za c-kit, CD135, CD162, CD164, CD184 (CXCR-4) in CD243 (Strbad, 2004).

Poleg imunološkega dokazovanja antigenov z označevalci lahko izolirano populacijo KMC identificiramo z molekularnimi tehnikami verižne reakcije s polimerazo (PCR), njeno različico RT-PCR (angl. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), ali z uporabo mikromrež DNK. Z metodo RT-PCR zasledujemo izražanje transkripcijskih dejavnikov, ki zavirajo ali aktivirajo prepisovanje genov, nadzorujejo potek hematopoeze (regulatorni geni HOX), so vključeni v diferenciacijo (receptorji za rastne faktorje) ali pa samo v proliferacijo (Strbad, 2004).

V KMC se aktivno prepisujejo geni homeobox kompleksa (HOX); HOXA, HOXB in HOXC, le HOXD so v KMC utišani. Ti geni se prepisujejo s konca 3'-konca lokusa, medtem ko se geni s 5'-konca aktivirajo kasneje v hematopoezi. Z metodo RT-PCR so v KMC dokazali prisotnost prepisov za aldehyd dehidrogenazo, pomembna sta tudi Notch1 in Wnt, ki zavirata diferenciacijo in favorizirata samoobnavljanje, vsi pa so tudi vpleteni v medcelično signaliziranje (Strbad, 2004).

2.2.2 Mezenhimske matične celice

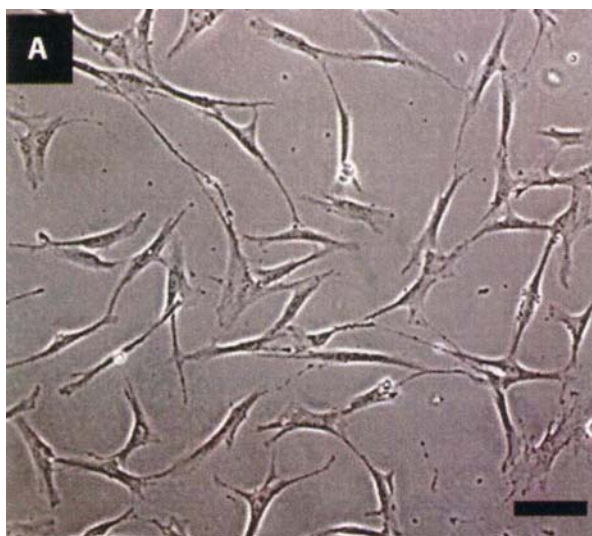
Mezenhimske matične celice (MMC) sta prva opisala Friedenstein in Petrakova leta 1966, Fridestein je prvi razvil tudi metode za njihovo izolacijo in gojenje (Jackson in sod., 2007).

MMC spadajo med stromalne celice KM in imajo dvojno vlogo: a) predstavljajo izvirne celice za ne-hematopoetska tkiva in hkrati b) hranilne celice za podporo rasti in diferenciacije krvnih celic in ostalih tkiv, saj sintetizirajo različne komponente zunajceličnega matriksa in različne rastne faktorje. So torej zelo pomembne pri ustvarjanju niše KMC, dokazali pa so tudi, da izboljšujejo preživetje KMC pri presaditvi (Locatelli in sod. 2007). MMC se poleg KM nahajajo tudi v drugih tkivih: popkovnični krvi, fetalnih jetrih, fetalnih pljučih, amnijski tekočini, periferni krvi, zobeh, kožnem tkivu in maščobnem tkivu (Jackson in sod., 2007).

MMC so multipotentne in lahko *in vitro* diferencirajo v celice mezodermalne linije (osteoblaste, adipocite, hondroците, mišične celice). Ugotovljeno je bilo tudi, da se lahko pod določenimi eksperimentalnimi pogoji diferencirajo tudi v celice drugih linij, npr. nevralne celice. MMC predstavljajo 0,001-0,01 odstotka MNC v humanem KM (Locatelli in sod., 2007).

Pri izolaciji lahko uporabimo več pristopov. Tradicionalno se izkorišča njihova sposobnost adherence na plastiko, s presajanjem celic v kulturi pa se nato zmanjšuje njihova heterogenost (Jackson in sod., 2007). Danes se za izolacijo vedno bolj izkorišča označevalce značilne za ta tip celic. Zanekrat še ni znanega specifičnega označevalca, ki bi ga lahko uporabili za njihovo neposredno izolacijo, zato se izkorišča različne predlagane skupine označevalcev, da na koncu pridobimo čim bolj homogeno populacijo MMC. Celice so negativne za krvotvorne označevalce CD14, CD34 in CD45 in pozitivne za številne adhezijske molekule, ki vključujejo CD73 (SH3, SH4), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2), CD166 (ALCAM) (Locatelli in sod., 2007). Markerji, ki jih različne skupine raziskovalcev uporabljajo za izolacijo MMC frakcije iz humanega kostnega mozga, vključujejo poleg zgoraj naštetih še: CD13, CD29, CD31, CD44, CD54, CD63, CD106, CD140b in Stro-1. MMC izražajo nizko stopnjo HLA molekul razreda I in ne izražajo HLA molekul razreda II. Primerjava markerjev, ki jih uporabljajo različne skupine, je pokazala, da večina izborov vključuje CD29 in/ali CD105, še vedno pa ni nekega splošnega konsenza o optimalni kombinaciji označevalcev MMC (Jackson in sod., 2007). Kolf in sodelavci predlagajo uporabo Stro-1 označevalca v kombinaciji z drugimi npr. s CD73 in CD106 (Kolf in sod. 2007). Mednarodno društvo za celično terapijo (angl. International Society for Cellular Therapy, ISCT) predlaga tri kriterije za izolacijo in karakterizacijo MMC: a) adherence na plastiko, b) pozitivni označevalci CD105, CD73, CD90, negativni CD45, CD34 in označevalci za monocite, makrofage in B celice in c) celice morajo biti sposobne diferenciacije v vsaj osteoblaste, adipocite in hondroblasti pod standardnimi *in vitro* pogoji (Kolf in sod., 2007).

MMC so v kulturi vretenaste oblike. Odvisno od tkiva, iz katerega izhajajo in pogojev v kulturi, lahko izražajo tudi: CD349, SSEA-4, Oct-4, nanog-3 in nestin (Buhring in sod., 2007)



Slika 10: Mezenhimske matične celice v kulturi (Docheva in sod., 2007)

Mnogi opozarjajo, da načini izolacije MMC niso idealni in da je v kulturi še vedno opaziti heterogeno populacijo celic in sicer majhne okrogle celice med fibroblastnimi MMC. Zato se pojavljajo dvomi o diferenciacijski sposobnosti MMC in o njihovi domnevni plastičnosti (Jackson in sod., 2007).

Humane MMC tudi po daljšem gojenju v kulturi ohranijo svojo diferenciacijsko sposobnost, so enostavno dostopne in niso etično sporne, zato so primerne za mnoge aplikacije s področja regenerativne medicine.

2.2.3 Endotelijske progenitorske celice

Endotelijske progenitorske celice (angl. Endothelial Progenitor Cells, EPC) je prvič opisal Asahara leta 1997. Izoliral jih je iz periferne krvi na osnovi ekspresije CD34 in drugih označevalcev endotelija na površini celic. Danes veliko podatkov podpira obstoj celic EPC. Celice EPC izhajajo iz KM in sodelujejo pri nastajanju novih krvnih žil. Njihovo odkritje je pripeljalo do koncepta, da vaskularizacija in angiogeneza lahko potekata simultano v postnatalnem obdobju, saj se lahko celice EPC diferencirajo v vaskularni endotelij (Ribatti, 2007).

Večina celic EPC se nahaja v KM, kjer so v tesnem stiku s KMC in stromalnimi celicami, ki tvorijo ustrezno mikrookolje. Celice EPC se lahko delijo, migrirajo in diferencirajo v celice endotelijske linije, nimajo pa še značilnosti zrelih endotelijskih celic. Urbich in Dimmeler sta celice EPC definirala kot neendotelijske celice, ki kažejo klonalno ekspresijo (sposobnost namnoževanja posamezne celice), imajo značilnosti matičnosti (sposobnost podvojevanja in odpornost na stres) in se lahko diferencirajo v endotelijske celice. Celice EPC, ki se nahajajo v periferni krvi, verjetno izhajajo iz KM in se še niso vgradile v stene žil. V živalskih modelih se celice EPC nahajajo na mestih aktivne neovaskularizacije in diferencirajo v endotelijske celice (Ribatti, 2007).

Celice EPC izražajo označevalce CD34 in VEGFR-2 (angl. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2). Tudi AC133, transmembranski glikoprotein z neznano funkcijo, so našli na celicah EPC, ne pa na zrelih endotelijskih celicah. AC133 naj bi bil trenutno tudi najboljši selekcijski označevalec za selekcijo celic EPC. Pred kratkim so ugotovili, da celice, ki so pozitivne za CD34 (in AC133 ali CD14) izražajo tudi Nanog in Oct-4, ki sta označevalca značilna za EMC. Te populacije celic so se sposobne diferencirati v endotelijske celice, adipocite, osteoblaste in nevralne celice. Trenutno ni znanega označevalca, ki bi bil značilen samo za celice EPC (Ribatti, 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 IDENTIFIKACIJA MATIČNIH CELIC

Kljub temu, da se tehnike za osamitev posameznih tipov celic iz leta v leto bolj izpopolnjujejo, imamo še vedno težave, kadar želimo izolirati čisto populacijo izbranih celic. Avtorji navajajo različne molekularne označevalce izbrane vrste MC, njihova mnenja si mnogokrat nasprotujejo in zato nabor označevalcev, ki bi omogočili izolacijo čiste populacije celic, ponavadi ni jasno določen ali znan. Zato so celo visoko prečiščene MC v bistvu heterogene tako po sestavi molekularnih označevalcev kot po svoji funkciji.

Identifikacija MC se nanaša na njihovo funkcijo – sposobnost regeneracije tkiv tekom življenja. Najzanesljivejše rezultate dobimo, če identificiramo lastnosti ene same celice, saj v tem primeru ni mogoče, da bi bil naš vzorec kontaminiran z neko drugo celično populacijo. Najboljšo informacijo o sposobnosti diferenciacije MC v celice kličnih plasti pa dobimo, če preverjamo tako morfološko kot funkcijsko raven diferenciranih celic.

In vivo dokaz, da so celice res pluripotentne MC, pa je njihova transplantacija v imunokompromitirane miške, kjer se v primeru, da gre res za pluripotentne MC, razvije na mestu implantacije teratom – tumor, ki vsebuje celice vseh treh kličnih plasti.

3.2 CILJI RAZISKAVE

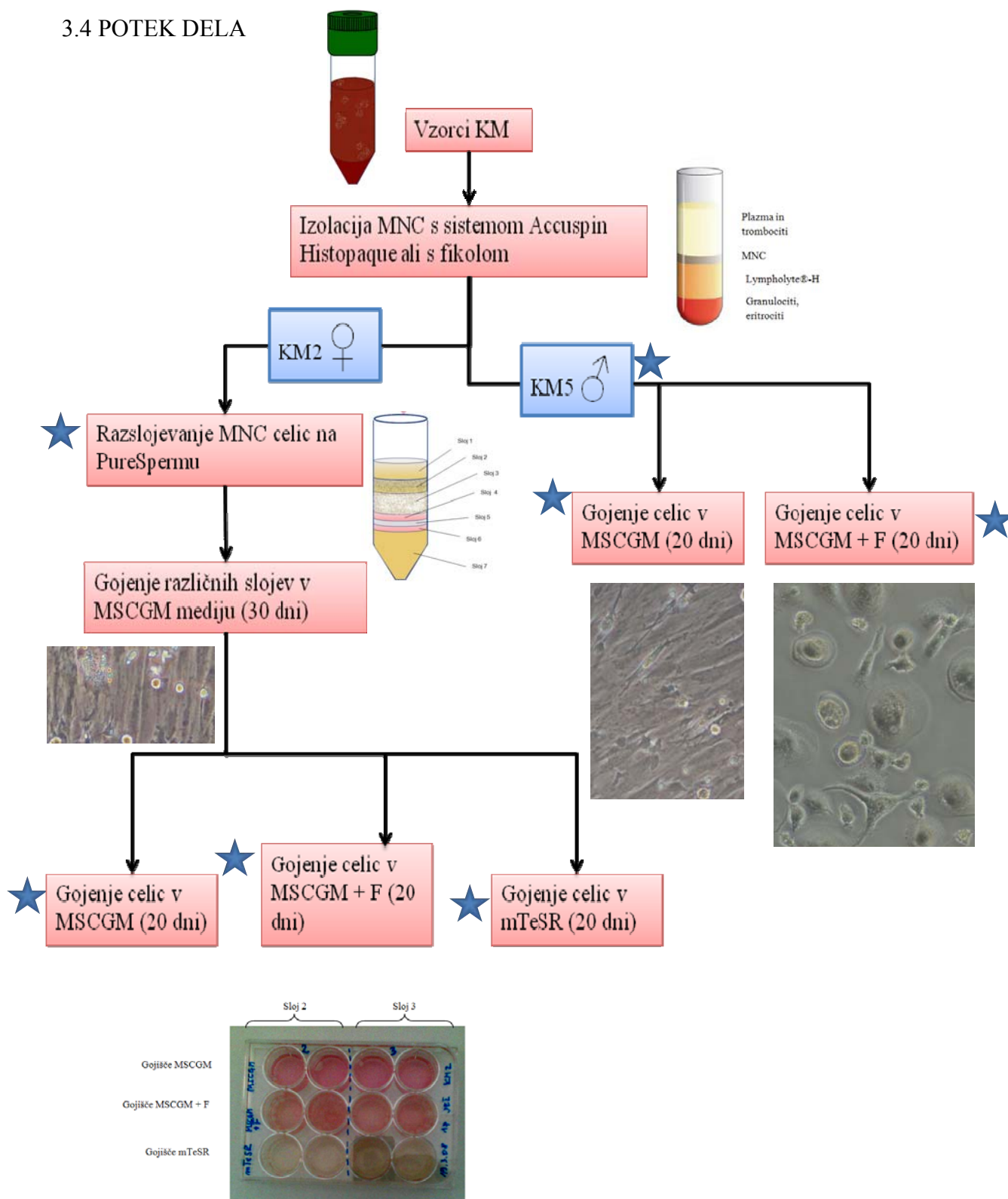
V KM odraslega se nahaja več vrst MC. Zadnje raziskave kažejo, da med njimi obstaja tudi subpopulacija MC z embrionalnimi lastnostmi, ki so ji različni avtorji nadeli različna imena. Namen dela je zato dokazati obstoj teh celic v KM ter določiti njihove embrionalne lastnosti in ugotoviti ali se lahko razvijejo v oocyte *in vitro*.

3.3 DELOVNA HIPOTEZA

Naše delovne hipoteze so naslednje:

- a) v KM odraslega človeka obstajajo MC z embrionalnimi lastnostmi,
- b) te celice lahko z obstoječimi metodami celične biologije izoliramo (osamimo),
- c) z metodami molekularne biologije lahko dokažemo, da izražajo ustrezen ekspresijski profil, značilen za EMC,
- d) z ustreznim gojenjem se lahko razvijejo v germinalne celice (oocyte).

3.4 POTEK DELA



Slika 11: Shema poteka dela, zvezdica (★) predstavlja odvzema vzorca za izolacijo RNA in izvedbo RT-PCR.

3.5 METODE

3.5.1 Pridobivanje vzorcev kostnega mozga zdravih preiskovancev

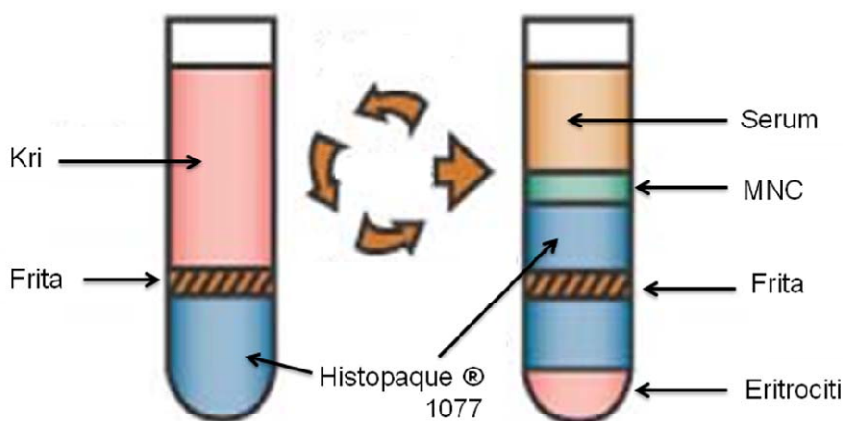
MC smo osamili iz 4 – 7 ml aspirata diagnostične punkcije KM oseb brez krvnih bolezni, ki so bile v diagnostičnem postopku na Kliničnem oddelku za hematologijo Kliničnega centra v Ljubljani. Postopek punkcije je opravil odgovorni zdravnik Kliničnega oddelka za hematologijo Kliničnega centra v Ljubljani. Vzoreček so odvzeli v epruvetke z antikoagulantom heparin.

Za delo z omenjenimi vzorci smo dne 18. 03. 2008 pridobili soglasje Komisije za medicinsko etiko 210/03/08 za študijo »Uporaba humane matične celice za zdravljenje«, hkrati pa tudi prostovoljni pristanek bolnika (priloga). Pri samem delu smo upoštevali določila Ovijske konvencije, Helsniške deklaracije, prav tako pa določbe Kodeksa medicinske deontologije Slovenije.

3.5.2 Izolacija mononuklearnih celic z gradientnim centrifugiranjem

3.5.2.1 izolacije frakcije MNC s sistemom Accuspin™ Histopaque® – 1077

KM vsebuje različne tipe celic – stromalne celice in KMC. Med stromalne celice spadajo vse nekrvotvorne celice: mezenhimske matične celice, osteoblasti, fibroblasti, retikularne celice in maščobne celice (Kiel in Morrison, 2008). Za ločevanje smo uporabili izolacijo frakcije mononuklearnih celic (MNC) s sistemom Accuspin™ Histopaque® – 1077 (The Accuspin™ System Histopaque® – 1077, Sigma-Aldrich). Ločevanje temelji na gradientnem centrifugiranju in ločevanju celic glede na njihovo gostoto.



Slika 12: Izolacija MNC s sistemom Accuspin™ Histopaque® – 1077

Ločevanje s sistemom Accuspin™ Histopaque® – 1077 je zelo podobno ločevanju s ficolom, la da proizvajalec v tem primeru nudi že vnaprej pripravljene centrifugirke dveh velikosti, v katerih se nahaja ustrezna količina reagenta Histopaque z gostoto 1,077 g/mL. Nad reagentom Histopaque je frita (polietilenska bariera visoke gostote), ki predstavlja porozno bariero in med ločevanjem zmanjša kontaminacijo z eritrociti.

Med postopkom ločevanja eritrociti agregirajo, granulociti pa postanejo hipertonični, rahlo se jim poveča sedimentacijski čas in zato se usedejo na dno centrifugirke. MNC celice ostanejo v plasti med reagentom Histopaque in plazmo.

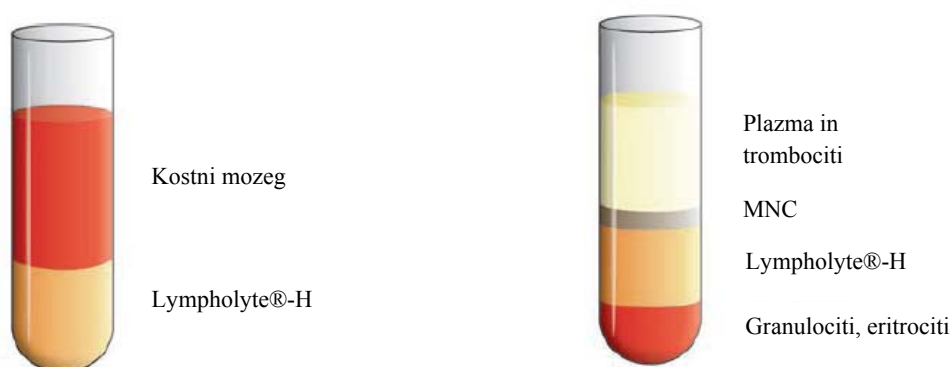
Centrifugirko s frito najprej segrejemo na sobno temperaturo in je pri tem ne izpostavljamo neposredni svetlobi. Če se je Histopaque nahajal nad frito, smo centrifugirko najprej centrifugirali pri $1000\times g$ 30 sekund pri sobni temperaturi. Uporabili smo 50 mL-centrifugirke Accuspin, pri katerih lahko v prostor nad frito naneseemo od 15,0 – 30,0 mL polne krvi oziroma KM. Zato smo vzorčke KM redčili s PBS do ustreznega volumna. V zgornjo komoro centrifugirke smo nato prosto nalili 15 mL ali več mešanice KM in PBS. Nato smo 10 min centrifugirali pri $1000\times g$. Pospeševanje in ustavljanje rotorja je bilo enakomerno, brez hitrega pospeševanja in naglega zaviranja. Temperaturo centrifugiranja smo nastavili med 18° in 26°C . Po končanem centrifugiranju smo previdno prenesli centrifugirke v laminarij in jih položili v stojalo. Pri tem smo pazili, da nismo premešali ločenih plasti. S pasterjevo pipeto smo previdno odpipetirali zgornjo plast plazme (približno 0,5 cm nad plastjo MNC). Pri tem smo pazili, da se nismo dotaknili plasti MNC. S svežo pasterjevo pipeto smo nato previdno prenesli plast MNC v svežo 15 mL-centrifugirko. Preostale komponente v centrifugirki skupaj s centrifugirko smo zavrgli. Sledilo je spiranje MNC. V centrifugirko s prenešenimi MNC smo nalili 10 mL raztopine za spiranje (PBS). Celice smo nežno resuspendirali s pasterjevo pipeto ali stripeto, nato pa zopet centrifugirali 10 min pri $250 \times g$ na sobni temperaturi. Po zadnjem centrifugiranju smo resuspendirali celice v gojitvenem mediju.

3.5.2.2 Izolacije frakcije MNC z uporabo fikola

Ker so izolirane MNC po zgornjem postopku vsebovale precej nezaželenih eritrocitov, smo poskusili še z izolacijo MNC s centrifugiranjem na fikolu Lympholyte®-H v upanju, da bomo dobili bolj čisto frakcijo MNC. Vendar pa frakcija MNC pridobljena po tem postopku ni vsebovala nič manj eritrocitov zato smo v nadaljevanju MNC zaradi preprostejšega postopka izolirali s sistemom Accuspin™ Histopaque® – 1077.

Lympholyte®-H ima gostoto 1,077 g/mL. Pred uporabo smo ga ogreli na sobno temperaturo. KM smo razredčili z enakim volumenom PBS. V 15 mL-centrifugirko smo s pipeto nanесли 3 mL Lympholyte®-H in nato nanj 6 mL razredčenega KM. Pri tem smo pazili, da nismo premešali faz. Nato smo 20 minut centrifugirali tako pripravljene centrifugirke z vzorčki na $800 \times g$. Med centrifugiranjem celice glede na svojo gostoto potujejo različno daleč vzdolž vertikalne osi raztopine. Eritrociti agregirajo in zato se jim poveča hitrost sedimentacije in se po centrifugiranju nahajajo v peletu na dnu centrifugirke. V peletu se po ločevanju nahajajo tudi granulociti. Limfociti, monociti in trombociti nimajo dovolj velike gostote, da bi penetrirali v plast fikola, zato se po ločevanju nahajajo na meji med plazmo in fikolom in so vidni kot bel obroček (slika 13). S spiranjem MNC nato odstranimo trombocite, ostanke plazme in fikola (GE Healthcare, 2005).

Po centrifugiranju smo s pasterjevo pipeto previdno pobrali MNC celice, ki so se nahajale v sloju med Lympholyte®-H in plazmo. Prenesli smo jih v novo centrifugirko. Na koncu smo jih še sprali s PBS.



Slika 13: Izolacija MNC z gradientnim centrifugiranjem na fikolu (GE Healthcare, 2005).

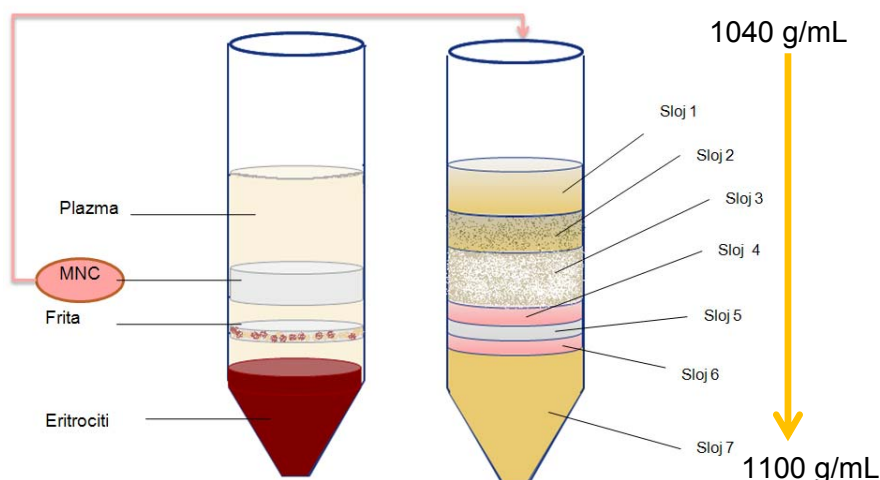
3.5.3 Ločevanje MNC z gradientnim centrifugiranjem na PureSpermu

PureSperm (Nidacn, Švedska) je koloidna suspenzija, ki je namenjena ločevanju normalnih humanih spermijev od limfocitov, epitelnih celic, semenske tekočine in abnormalnih spermijev pri postopkih umetne oploditve. Sami smo jo uporabili z drugačnim namenom, in sicer smo želeli ločiti frakcije različnih celic, ki se nahajajo znotraj MNC celic izoliranih iz KM. PureSperm ima gostoto 1,100 g/mL. MNC izolirane s sistemom Accuspin™ Histopaque® – 1077 smo prenesli na prej pripravljeni gradient PureSperma od 1040 – 1100 g/L.

V 15 mL-epruvete smo najprej nanesti 2 mL 100-odstotnega PureSperma in nato nanj previdno še 2 mL 40-odstotnega PureSperma. 40-odstotno mešanico smo pripravili z ustreznim redčenjem PureSperma z DMEM-F12 medijem za gojenje celic. Na ta dva sloja smo previdno nanesti do 1,5 mL suspenzije MNC celic. Tako pripravljene centrifugirke smo centrifugirali 30 min na 1200 vrt./min. Po centrifugiranju smo v centrifugirki opazili 7 slojev (slika 14).

Po ločevanju s sistemom Accuspin™
Histopaque® – 1077

Po ločevanju na PureSperm (7 slojev)



Slika 14: Separacija MNC na PureSpermu

Vsakega od slojev smo previdno pobrali – en del, ki smo ga namenili za analizo RT-PCR v mikrocentrifugirko, ki smo jo nato do analize zamrznili na -80°C , drugi del pa v 25 cm^2 posodico za gojenje celic.

3.5.4 Gojenje različnih slojev mononuklearnih celic v različnih medijih

3.5.4.1 Gojenje celic

Celice KM2 vseh sedmih različnih slojev, ki smo jih pridobili po ločevanju na PureSpermu, smo gojili v gojilnih posodicah velikosti 25 cm^2 v MSCGM mediju. Gojilne posodice s celicami smo gojili v CO_2 inkubatorji Heracell (Heraeus, Nemčija) pri temperaturi 37°C in v atmosferi s 5-odstotnim CO_2 . Po nekaj dneh, ko so se celice pritrdile, smo zamenjali medij in na ta način odstranili tudi velik del eritrocitov, ki so se še nahajali v naši kulturi. Nato smo pod mikroskopom opazovali, kakšni tipi celic so prisotni v kulturi.

Vsake 3-4 dni smo menjavali gojišče. Celic nismo presajali, tudi če so rasle v konfluentnem stanju, da ne bi med presejevanjem izgubili zgodnjih MC. Po 30 dneh gojenja smo celice tripsinizirali (celice sloja 1 in 7 smo zavrgli, ker v kulturi ni bilo skoraj nič celic) in jih nasadili v plošče z dvanajstimi luknjami (še vedno smo ločeno gojili različne sloje), kjer smo nato uporabili tri različna gojišča. Vsakega smo uporabili s specifičnim namenom. Gojišče MSCGM smo uporabili kot negativno kontrolo, saj so v njem celice ostale take, kot smo jih izolirali iz KM. Gojišče MSCGM z dodatkom folikularne tekočine (F) smo uporabili z namenom diferenciacije zgodnjih matičnih celic celic v oocyte, za gojišče mTeSR pa smo predpostavili, da se bodo v njem zgodnje matične celice celice ohranile v nediferencirani obliki in se mogoče še namnožile.

Preglednica 7: Lastnosti uporabljenih gojišč

Ime gojišča	Lastnosti
MSCGM	MSCGM (Mesenchymal Stem Cell Growth Medium) je namenjen gojenju večjega števila mezenhimskih matičnih celic in za ohranjanje njihovega nediferenciranega stanja.
mTeSR TM 1	Definirano gojišče brez seruma, ki je namenjeno vzdrževanju in razmnoževanju embrionalnih matičnih celic v nediferenciranem stanju brez uporabe hranilnih slojev. Medij vsebuje rekombinantni humani fibroblastni rastni faktor (rh bFGF) in rekombinantni humani transformirajoči rastni faktor β (rh TGF β). Poleg teh dveh vsebuje še druge manj pomembne rastne faktorje in proteine: GABA, humani inzulin, pipekolično kislino, humani holo-transferin, humani serumski albumin in glutation. Dodajanje dodatnih rastnih faktorjev ni potrebno.
MSCGM+F	V medij MSCGM smo dodali 30-odstotni volumski delež folikularne tekočine, ki smo jo pridobili po spodaj opisanem postopku.

MNC celice izolirane iz KM5 smo nasadili v plošče z dvanajstimi luknjicami in jih 35 dni gojili v dveh različnih gojiščih – v MSCGM in v MSCGM z dodatkom F.

3.5.4.2 Spremljanje morfologije celic z uporabo svetlobnega mikroskopa

Gojene celice smo vsak dan opazovali pod invertnim mikroskopom (Nikon Eclipse TE300, Japonska) in jih vsakih nekaj dni, oz. ko je bilo opaziti vidne spremembe v kulturi, tudi fotografirali. Med gojenjem celic v mediju MSCGM z dodatkom F smo pričakovali *in vitro* oogenezo in smo razvoj oocitom podobnih celic spremljali z opazovanjem standardnih morfoloških kriterijev (okrogla oblika, prisotnost zone pellucide, germinalnega vezikla ali polarnega telesca) in velikosti celic (premer okoli 90 μm), saj nobena druga celica v telesu ne doseže take velikosti kot jajčna celica (Virant-Klun in sod., 2008a).

3.5.4.3 Priprava folikularne tekočine

Vzorci folikularne tekočine smo dobili s Kliničnega oddelka za ginekologijo na Ginekološki kliniki v Ljubljani. Folikularno tekočino smo najprej razporedili v 15 mL-centrifugirke in jo centrifugirali 10 min na 2000 vrt./min. S tem smo se znebili eritrocitov in ostalih celic, ki jih je v sami folikularni tekočini kar precej. Nato smo supernatant prefiltrirali skozi 0,22 μm filter. Centrifugirko s prefiltrirano folikularno tekočino smo segrevali 45 min na 56°C v vodni kopeli. S segrevanjem se inaktivira komplement. Po segrevanju smo folikularno tekočino alikvotirali in zamrznili in nato uporabljali kot 30-odstotni volumski dodatek h gojišču.

3.5.5 Izolacija RNA

Za izolacijo RNA smo uporabili RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija).

Pred izolacijo smo ocenili, koliko celic se nahaja v vzorčkih, saj je od njihovega števila (do 5×10^6 celic ali več kot 5×10^6 celic) odvisno dodajanje kemikalij med postopkom izolacije.

Najprej smo celice v mikrocentrifugirkah odmrznili in nato dobro premešali. Po mešanju smo jih 5 min centrifugirali na 5000 vrt./min pri T 20-25°C. V prvem koraku smo dodali pufer RLT, ki celice lizira. Pufer RLT smo si predhodno pripravili tako, da smo dodali β -merkaptotanol (na 1 mL pufera RLT dodamo 10 μL β -merkaptotanol). V mikrocentrifugirke, kjer je bilo manj kot 5×10^6 celic smo dodali 350 μL pufera RLT, v mikrocentrifugirke kjer smo imeli več kot 5×10^6 celic pa 600 μL pufera RLT. Po dodatku pufera RLT smo celice temeljito premešali. Lizat smo nato prenesli na kolono gDNA Eliminator in spodaj namestili mikrocentrifugirko za zbiranje. Namen tega koraka je vezava genomske DNA na kolono. Kolone smo namestili v centrifugo in centrifugirali 30 s na 10 000 vrt./min. Zgornje dele kolone smo po centrifugiranju zavrgli in vzorcu dodali 70-odstotni etanol v istem volumnu kot smo na začetku dodali pufer RLT. Po 700 μL vzorca smo nato prenesli na kolono za centrifugiranje RNeasy, ki ima spodaj nameščeno 2 mL-zbirno kolono. V tem koraku se vsa RNA ujame na filtru v koloni in se sprosti šele v zadnjem koraku izolacije. Sledilo je centrifugiranje kolon RNeasy 15 s na 10 000 vrt./min. V primeru, ko je bilo v enem vzorcu več kot 700 μL , smo po centrifugiranju preostanek ponovno nanesti na isto kolono kot prvih 700 μL in ponovno centrifugirali. Nato smo zavrgli spodnje dele kolon in jih zamenjali z novimi. Sledilo je spiranje s puffrom RW in sicer smo dodali 700 μL . Zopet smo centrifugirali 15 s na 10 000 vrt./min. Vsebinsko v spodnjih kolonah smo odlili. Nato smo dodali 500 μL pufera RPE in centrifugirali 15 s na 10 000 vrt./min. Ta pufer vsebuje etanol in je namenjen še dodatnemu spiranju. Zopet smo

spraznili spodnje kolone in še enkrat dodali 500 µL pufru RPE in centrifugirali 1 min na 14 000 vrt./min. Nato je sledila elucija RNA s kolone. Najprej smo si označili mikrocentrifugirke iz kita, ki so brez DNaz in RNaz, v katere smo v naslednjih korakih eluirali RNA. Zgornje dele kolon smo prestavili v mikrocentrifugirke in v kolono dodali 40 µL vode iz kita in centrifugiramo 1 min na 10 000 vrt./min. Ker smo želeli čim bolj koncentrirano RNA, smo eluirani vzorec še enkrat spustili skozi kolono. Kolone smo nato zavrgli in shranili RNA v označeni mikrocentrifugirki.

3.5.6 Preverjanje izražanja izbranih embrionalnih označevalcev in označevalcev oogeneze z metodo RT-PCR

Z metodo RT-PCR smo preverjali embrionalne (preglednica 8) označevalce in označevalce oogeneze (preglednica 9).

Preglednica 8: Embrionalni označevalci

Označevalec	Funkcija
Oct-4	Je ključni regulator pluripotentnosti in pripada družini POU transkripcijskih faktorjev (sinonimi: POU5f1, Oct3, Oct3/4). Izraža se v EMC, njegova ekspresija se zmanjša, ko se celice diferencirajo. Je edini znani transkripcijski faktor, ki se specifično izraža v zgodnjem zarodku, germinalnih celicah in pluripotentnih celicah. Z eksperimenti s transgenskimi mišjimi celicami so dokazali, da je Oct-4 nujen za pluripotentnost celic – zarodki z inaktiviranim <i>Pou5f1</i> lokusom niso bili sposobni razviti ICM. Kvantitativne študije pa so pokazale, da EMC v odvisnosti od nivoja izražanja Oct-4 vzdržujejo pluripotentnost ali pa diferencirajo (Morris in sod., 2005).
Sox-2	Sox-2 je gen brez intonov, ki kodira transkripcijski faktor SOX-2 (sinonim: SRY-box 2, sex determining region-box 2), ki je ključen za samoobnavljanje in ohranjanje nediferenciranega stanja EMC (SOX2 SRY, 2008).
Nanog	Transkripcijski faktor Nanog je pomemben regulator v zgodnjem razvoju sesalcev in ključen faktor za določanje pluripotentnosti v EMC. Nanog se veže na promotorje več sto genov in preko še vedno neznanih mehanizmov regulira njihovo ekspresijo. Ekspresijo genov lahko regulira pozitivno ali negativno. Mutacija, kjer je izničena funkcija Nanoga je letalna že v embrionalnem razvoju, povzroči pa tudi diferenciacijo v linijo EMC podobno endodermu. Povečana ekspresija Nanoga pa omogoči samoobnavljanje mišjih EMC brez prisotnost leukemičnega inhibitornega faktorja (LIF). Zmanjšano izražanje Nanog v EMC vodi v diferenciacijo celic. Zanimivo je, da se Nanog veže na promotorje, na katere se vežeta tudi Oct-4 in Sox-2 (Jauch in sod., 2008).
c-kit	c-kit je tirozin kinazni receptor, ki se izraža na krvotvornih celicah, predniških celicah in tudi na celicah iz nekrvotvornih tkiv. Humani tirozin kinazni receptor se imenuje tudi CD117, nanj pa se veže stem cell faktor. V KM se c-kit specifično izraža na predniških celicah. Med zorenjem celic se njegova ekspresija zmanjša, z izjemo pri mastocitih, kjer se ohrani visoka ekspresija. Pri miših je posledica mutacij v lokusu, ki kodira receptor ali v lokusu, ki kodira ligand, letalna anemija, napake KMC in pomenjkanje mastocitov. Receptor c-kit sproža več signalnih poti, ki so pomembne za regulacijo proliferacije, preživetja in drugih ključnih funkcij KMC. Ima tudi onkogeni potencial, saj konstitutivna ekspresija receptorja c-kit lahko povzroči nastanek tumorja (Edling in Hallberg, 2007).

Preglednica 9: Geni, značilni za oogenezo in za jajčno celico

Označevalec	Funkcija
c-kit	c-kit je tirozin kinazni receptor, ki se izraža na krvotvornih celicah, predniških celicah in tudi na celicah iz nekrvotvornih tkiv. Humani tirozin kinazni receptor se imenuje tudi CD117, nanj pa se veže stem cell faktor. V KM se c-kit specifično izraža na predniških celicah. Med zorenjem celic se njegova ekspresija zmanjša, z izjemo pri mastocitih, kjer se ohrani visoka ekspresija. Pri miših je posledica mutacij v lokusu, ki kodira receptor, ali v lokusu, ki kodira ligand, letalna anemija, napake KMC in pomanjkanje mastocitov. Receptor c-kit sproža več signalnih poti, ki so pomembne za regulacijo proliferacije, preživetje in druge ključne funkcije KMC. Ima tudi onkogeni potencial, saj konstitutivna ekspresija receptorja c-kit lahko povzroči nastanek tumorja (Edling in Hallberg, 2007).
VASA	Označevalec germinalnih celic, ki se izraža samo v ovariju in testisu. Izraža se v spermatogenih celicah od stadija spermatocita do stadija okrogle spermatide in v migrirajočih primordialnih germinalnih celicah v območju gonadalnih grebenov pri obeh spolih. Pomemben je za spermatogenezo, embriogenezo in celične delitve ter rast. Gen se specifično izraža v liniji germinalnih celic pri obeh spolih in je povezan z razvojem spolnih celic – označevalec germinalnih celic (DDX4 DEAD, 2008).
SCP3 (SYCP3)	Med mejozo pride do parjenja in rekombinacije homolognih kromosomov. Po mejozi dobimo genetsko različne haploidne celice. Obnašanje kromosomov, ki je značilno za mejozo, naj bi bilo povezano z aktivnostjo sinaptonemičnih kompleksov (SC, sinaptonemični kompleks). Pri sesalcih so določili tri za mejozo specifične komponente SC: SCP1, SCP2, SCP3. SCP3 (angl. Synaptonemal Complex Protein 3) je torej označevalec mejoze (Yuan in sod., 2000).
ZP2 ZP3	Jajčno celico sesalcev obdaja <i>zona pellucida</i> (ZP), ki je pomembna pri interakciji med jajčecem in spermijem pri oploditvi. ZP sestavljajo dolgi filamenti iz dveh glikoproteinov ZP2 (<i>zona pellucida</i> glikoprotein 2) in ZP3 (<i>zona pellucida</i> glikoprotein 3), ki jih med sabo povezuje tretji glikoprotein ZP1 (<i>zona pellucida</i> glikoprotein 1). Prisotnost ZP2 in ZP3 je nujna za tvorbo ZP okoli rastočega jajčca in za plodnost samic (Wassarman in sod., 2004).

3.5.6.1 RT-PCR

Pri metodi RT-PCR preverjamo ekspresijo genov. RNA, izolirana iz celične kulture, med postopkom prepisemo v komplementarno DNA, ki jo nato pomnožimo s specifičnim parom začetnih oligonukleotidov. Ti so oblikovani za vsak markerski gen posebej in sicer tako, da se prilegajo samo na mestu gena, ki nas zanima, zato v reakciji PCR pomnožujemo le ta odsek. Če se iskani gen v celicah ni izražal, torej med izolirano RNA ni prepisa iskanega gena, se iskani odsek v reakciji ne bo pomnožil, zato tudi na gelu po elektroforezi ne bomo videli lise.

Preglednica 10: Priprava reakcijske mešanice za PCR za en vzorec

Komponenta	Volumen [μL]
2× reakcijski pufer	12,5
Smiselni (sense) začetni oligonukleotid	0,6
Protismiselni (antisense) začetni oligonukleotid	0,6
Mešanica reverzne transkriptaze in polimeraze	1
RNA	3*
H ₂ O	2,3**

* RNA lahko damo v reakcijsko mešanico tudi manj, če imamo zelo visoko koncentracijo izolirane RNA.

** Vodo uporabimo, da dopolnimo volumen reakcije do izbranega volumna reakcijske mešanice (sami smo delali z 20 μL reakcijo).

Pri vsakem označevalcu, ki smo ga preverjali, smo dodali še pozitivno (poznana RNA) in negativno kontrolo (voda), s katerima smo preverili uspešnost PCR.

RT-PCR smo izvedli na aparaturi GeneAmp[®], PCR System 9700 (Applied Biosystems, ZDA).

Za pomnoževanje različnih označevcev smo uporabili različne programe za PCR. Program ZP: prva stopnja je namenjena sintezi cDNA in traja 30 min pri 50°C. Nato se za 2 min temperatura dvigne na 94°C. Ta čas je namenjen inaktivaciji encima reverzne transkriptaze, denaturaciji RNA/DNA kompleksov in aktivaciji DNA polimeraze, ki je ključna za sintezo nove DNA v naslednji stopnji. Nato sledi 30 ciklov podvojevanja DNA fragmentov. Cikli so sestavljeni iz treh delov. Prvi del je namenjen denaturaciji dvoverižne DNA in poteka 1 minuto pri 95°C. Nato sledi 1 minuta pri 57°C, ki je namenjena prileganju začetnih oligonukleotidov. V zadnjem delu, ki traja 1 minuto pri temperaturi 72°C, pride do podaljševanja fragmentov DNA. Na koncu programa je še 10 minut pri temperaturi 72°C; ta čas je namenjen dokončanju vseh fragmentov, ki se pomnožujejo.

Program ZP smo uporabili za označevalec ZP2, program OctAB za ZP3, Oct-4AB, program VASA za označevalce SCP-3, VASA, c-kit in program GINEKO-INVITROGEN za Nanog in Sox-2.

Programi so si v osnovi podobni in so sestavljeni iz enakih stopenj, spreminja se le število ciklov pomnoževanja in temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov. Uporabljeni programi so opisani v preglednici 11. V preglednici 12 pa so navedene sekvence začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za pomnoževanje označevalcev.

Preglednica 11: PCR programi

Program	Prva stopnja – sinteza cDNA	Inaktivacija reverzne transkriptaze, denaturacija RNA/DNA kompleksov in aktivacija DNA polimeraze	Podvojevanje DNA odseka	Dokončna izgradnja vseh fragmentov
ZP	50°C, 30 min	94°C, 2 min	95°C, 1 min 57°C, 1 min 72°C, 1 min 30 ciklov	72°C, 10 min
OctAB	50°C, 30 min	94°C, 2 min	95°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C, 1 min 35 ciklov	72°C, 10 min
VASA	50°C, 30 min	94°C, 2 min	94°C, 30 s 55°C, 30 s 72°C, 30 s 38 ciklov	72°C, 10 min
GINEKO-INVITROGEN	50°C, 30 min	94°C, 2 min	94°C, 30 s 60°C, 30 s 72°C, 1 min 40 ciklov	72°C, 10 min

Preglednica 12: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za namnoževanje označevalcev oogeneze in embrionalnih označevalcev (Virant-Klun in sod., 2008a razen za Oct-4AB in ZP3).

Gen	Začetni oligonukleotid	Dolžina (bp)
Oct-4A (Takeda in sod., 1992)	Oct-4AF: ctctctggaggccaggaatc Oct-4AR: ccacatcggcctgtgtatat	381
Oct-4B (Takeda in sod., 1992)	Oct-4BF: atgcatgagtcagtgaacag Oct-4BR: ccacatcggcctgtgtatat	303
Sox-2	Sox-2F: atgcaccgctacgacgtga Sox-2R: cttttgcacccctcccattt	437
Nanog	NanogF: tgcaaatgtcttctgctgagat NanogR: ttcaggatgttgagaggttc	285
c-kit	c-kitF: aaggacttgagtttattcct c-kitR: ctgacgttcataattgaagtc	345
VASA	VASA-F: gactgcggcttttctctacc VASA-R: ttggcgctgttctttgat	416
SCP3	SCP3-F: gggaagccgtctgtgga SCP3-R: tgttttcaatctctggctctg	486
ZP2	ZP2-F: gcctcccaggaccattctc ZP2-R: caggtagcagatggagccta	254
ZP3 (Lefievre in sod., 2004)	ZP3-F: gaggcagcctcatgtcatg ZP3-R: aggcaaagcccactgctc	1300
c-kit	c-kitF: aaggacttgagtttattcct c-kitR: ctgacgttcataattgaagtc	345

3.5.6.2 Priprava agaroznega gela

Za ločevanje PCR produktov smo uporabili 1- in 2-odstotni agarozni gel; odvisno od dolžine PCR produkta. Za pripravo 1-odstotnega agaroznega gela smo zatehtali 0,8 g agaroze in jo raztopili v 80 mL pufra TBE. Pri pripravi 2-odstotnega gela pa smo zatehtali 1,6 g agaroze in jo prav tako raztopili v 80 mL pufra TBE. Pufer z agarozo smo postavili v mikrovalovno pečico in segrevali dokler ni bila raztopina popolnoma bistra (se je agarozna popolnoma raztopila). Medtem, ko se je gel ohlajal, smo si pripravili na obeh straneh zatesnjen modelček in vstavili glavniček z ustreznim številom lukenj. V nekoliko ohlajen gel smo dodali 3,5 μ L etidijevega bromida, ki se vriva med bazne pare in povzroči, da DNA fluorescira v UV delu spektra. Gel smo nato počasi vlili v modelček in pazili, da niso nastali mehurčki. Nato se je gel 15-20 min strjeval. Ko se je strdil, smo previdno odstranili glavniček in gel vzeli iz modela ter ga potopili v pufer v napravi za elektroforezo.

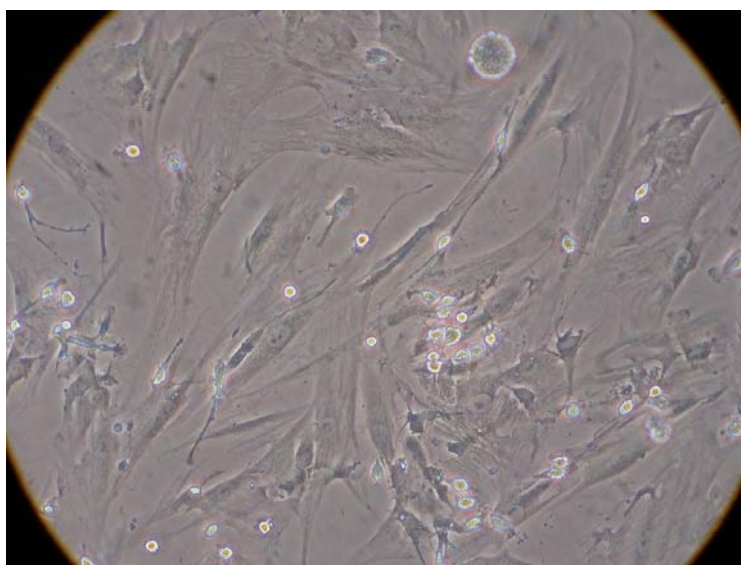
3.5.6.3 Elektroforeza

Vzorke pred nanosom v žepke obarvamo in obtežimo tako, da jih zmešamo z nanašalnim barvilom in sicer smo imeli 20 μL -vzorke, ki smo jih zmešali s 4 μL nanašalnega barvila. Vzorčke smo naložili na gel in priklopili aparat za elektroforezo (Power Pac 300, Bio Rad, Kalifornija, ZDA). Tok smo nastavili na 400 mA, napetost na 110 V, čas ločevanja pa smo nastavili na 30 min. Izjema so bili dolgi fragmenti, kjer smo čas ločevanja podaljšali na 60 min.

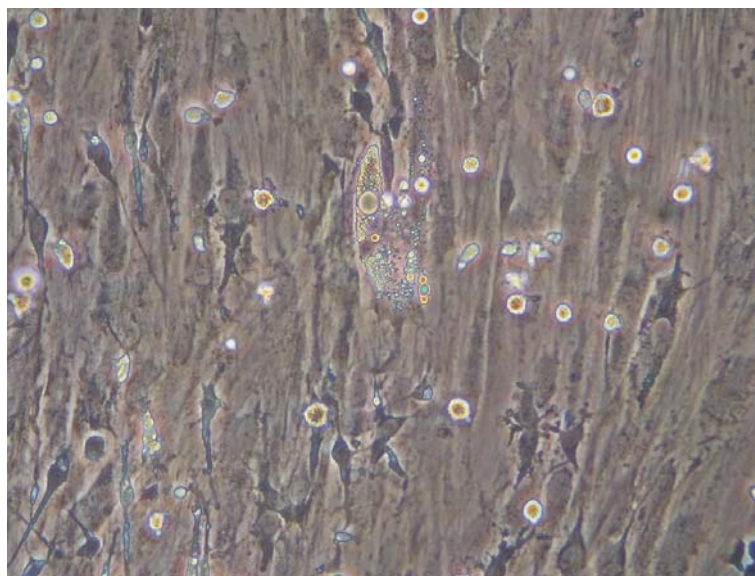
4 REZULTATI

4.1 KULTURA MONONUKLEARNIH CELIC

Po nekaj dneh gojenja se je večina izoliranih celic MNC pritrdila na dno gojilne posodice (slika 15). Vseeno pa je bilo v kulturi tudi veliko majhnih bolj ali manj okroglih celic. Večinoma so bile rumenkaste barve in so se nahajale na pritrjenih celicah. V nekaterih kulturah je bilo mogoče opaziti tudi adipocite (slika 16). Celice so v kulturi uspešno rasle tudi do 2 meseca. Opazili pa smo, da se je po daljšem gojenju zmanjšalo število majhnih okroglih rumenkastih celic. Po daljšem gojenju smo v kulturah opazili tudi celice podobne živčnim celicam – zelo dolge in razvejane.



Slika 15: KM v kulturi (medij MSCGM), svetlobni mikroskop (Nikon Eclipse TE300, Japonska), povečava 200-krat.



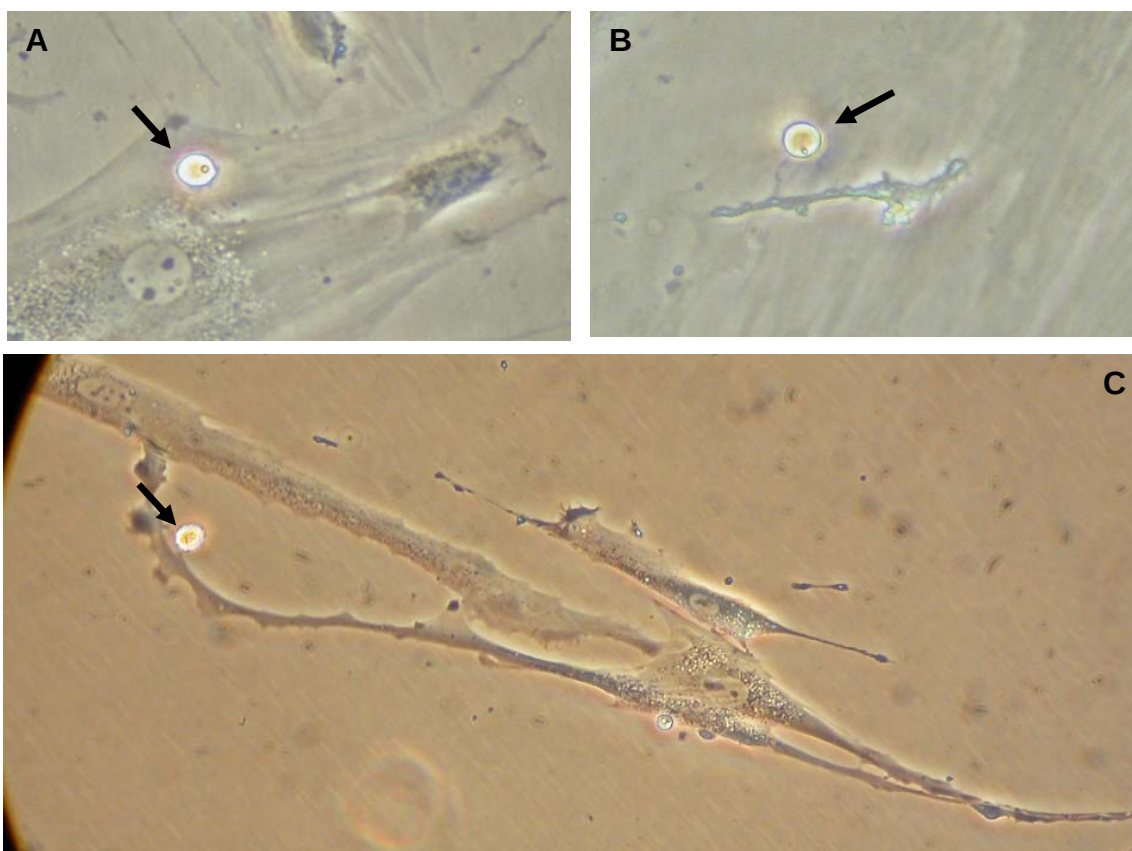
Slika 16: KM v kulturi, na sredini so vidne maščobne celice (medij MSCGM), svetlobni mikroskop (Nikon Eclipse TE300, Japonska), povečava 200-krat

4.2 POSKUS S KOSTNIM MOZGOM PROSTOVOLJKE (KM2)

4.2.1 Opazovanje kulture mononuklearnih celic pod mikroskopom in poskus identifikacije zgodnjih matičnih celic

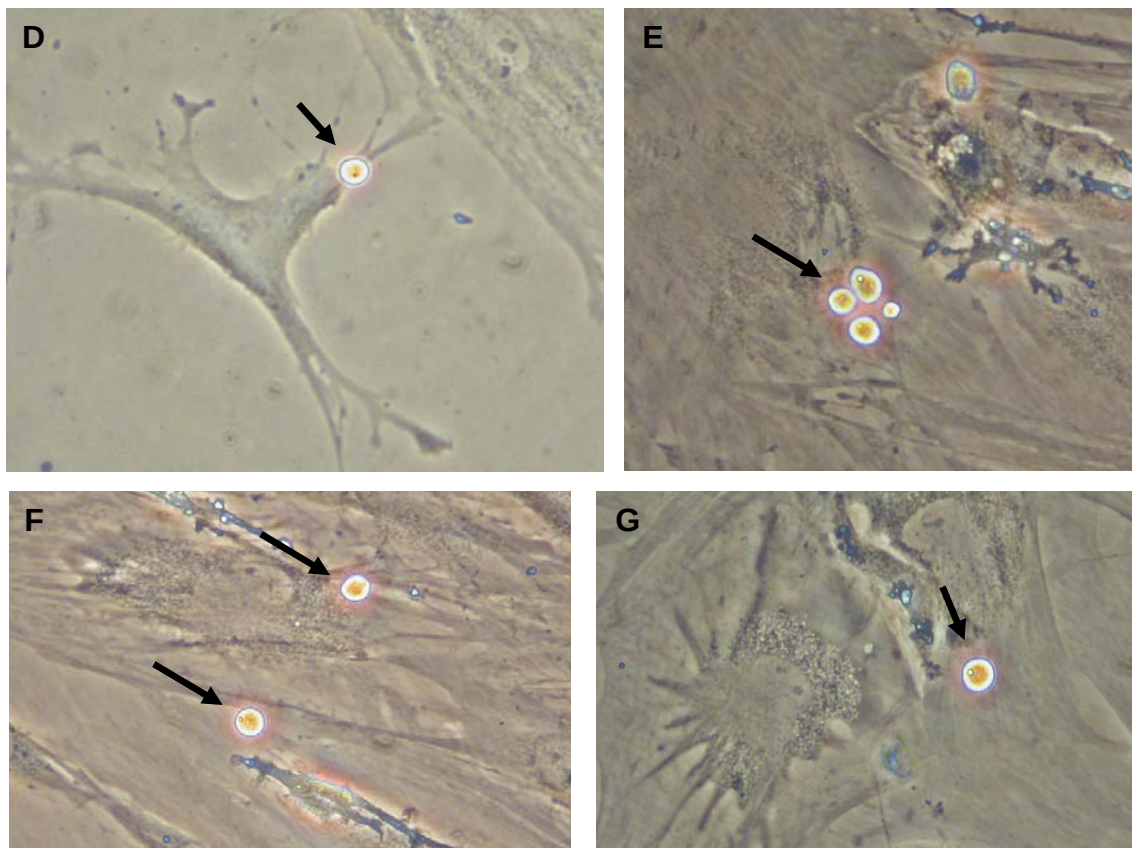
Ko so se MNC celice gojene v mediju MSCGM pritrdile na podlago in se je vzpostavila tipična kultura MNC celic iz KM, smo kulturo podrobno pregledali s svetlobnim mikroskopom. Iskali smo majhne okrogle celice enake tistim, ki jih je v svojih dveh člankih opisala Virant-Klun s sodelavci (Virant-Klun in sod., 2008a; Virant-Klun in sod., 2008b). V vseh slojih, ki smo jih dobili po ločevanju na PureSpermu, smo našli majhne okrogle celice, za katere predvidevamo, da so iskane zgodnje MC. Celice so rumenkaste barve in imajo majhen mehurček. Občasno se je več teh celic nahajalo v skupini, večinoma pa smo videli po eno naenkrat.

Med opazovanjem kulture MNC celic s svetlobnim mikroskopom smo opazili, da se celice, za katere predvidevamo, da so iskane pluripotentne matične celice pri odraslem, vedno nahajajo v bližini fibroblastnih celic v kulturi. Včasih izgleda celo kot bi bile nanje pritrjene (slika 17). Predvidevamo, da se celice nahajajo v niši v KM, ki jo tvorijo različne stromalne celice. Fibroblasti očitno izločajo neke faktorje, ki pozitivno vplivajo na MC.



Nadaljevanje slike na naslednji strani.

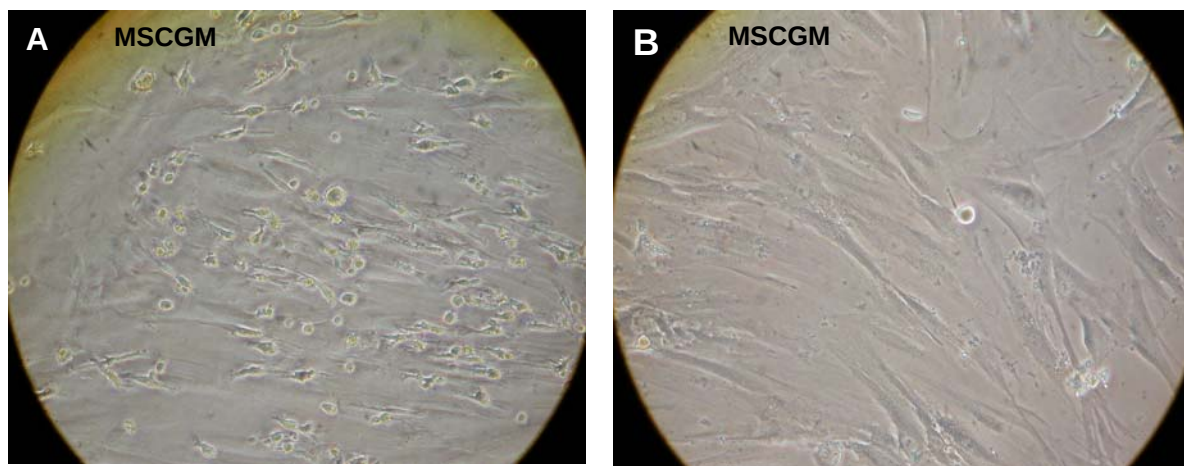
Nadaljevanje.



Slika 17: Potencialne zgodnje matične celice v kulturi (puščice), svetlobni mikroskop (Nikon Eclipse TE300, Japonska), povečava 200-krat. Celice so majhne, okrogle in rumenkaste barve, vidna je vakuola (A, B, D, E, G). Nahajajo se na drugih pritrjenih celicah v kulturi (A, D) ali pa so v njihovi neposredni bližini (B, C). Predpostavljamo, da so pritrjene na druge celice v kulturi, saj so se kljub menjavi medija ohranile v kulturi. Redko se jih več nahaja skupaj (E).

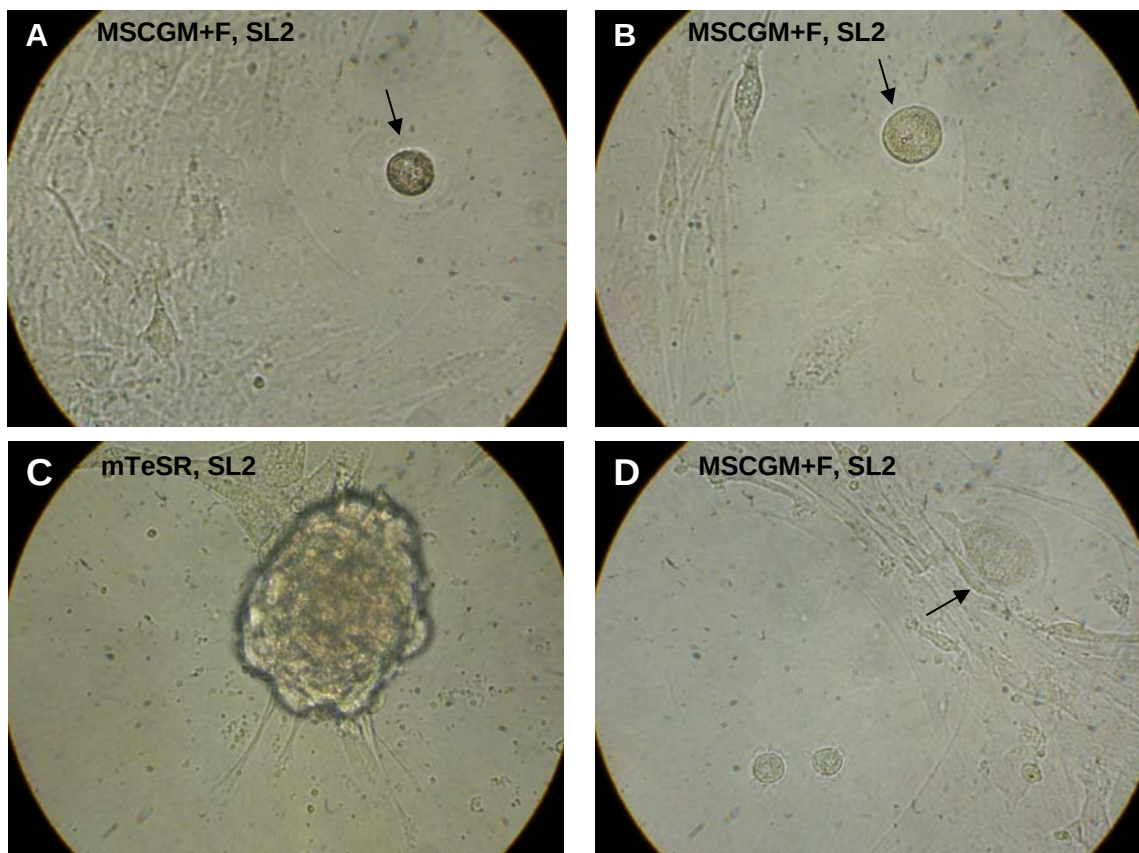
4.2.2 Opazovanje kulture mononuklearnih celic pod mikroskopom in poskus identifikacije oocitom podobnih celic

Med gojenjem celic MNC v treh različnih gojiščih smo z opazovanjem pod mikroskopom spremljali njihovo rast in pričakovani razvoj v jajčnim celicam podobne celice v mediju z dodatkom F. V mediju MSCGM, ki smo ga uporabili kot negativno kontrolo, v nobenem izmed slojev ni prišlo do razvoja velikih oocitom podobnih celic (slika 18).

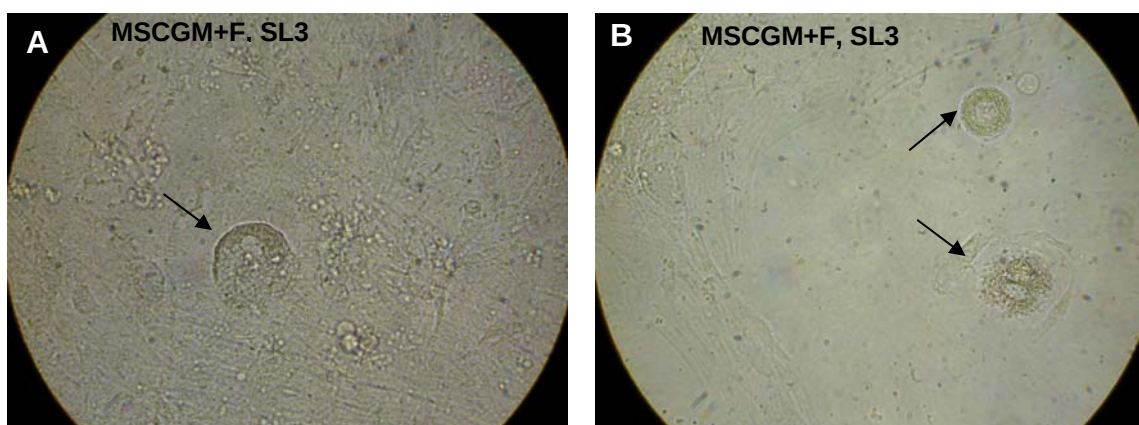


Slika 18: Fotografije celic KM v kulturah tik pred izolacijo RNA po 20 dneh gojenja v mediju MSCGM. Vidimo, da ni prišlo do razvoja velikih okroglih oocitom podobnih celic (svetlobni mikroskop Nikon Eclipse TE300, Japonska, povečava: 200-krat).

Na spodnjih slikah (slika 19, 20, 21, 22, 23) so fotografije jajčnim celicam podobnih celic, ki so se razvile v mediju MSCGM z dodatkom F, nepričakovano pa smo jih opazili tudi v mediju mTeSR. Medij MSCGM z dodatkom F je imel sicer največji vpliv na oogenezo izmed preiskušanih treh gojišč, okrogle celice v njem so bile velikosti 50-80 μm . Tudi v mediju mTeSR je opaziti velike okrogle celice, ki pa nimajo struktur podobnih *zoni pellucidi* (slika 20D, 21D). Predvidevamo da gre za zgodnejše stopnje v razvoju oocitov, kot v mediju MSCGM z dodatkom F. V nadaljnjih poskusih bi bilo dobro uporabiti medij mTeSR z dodatkom F. Okrogle celice v mediju mTeSR tudi niso dosegle take velikosti kot v mediju MSCGM z dodatkom F. Celice v mediju mTeSR kažejo predvsem težnjo po tvorbi embrioidnih teles (slika 19C, 20C, 21C, 22D). Strukture, ki so podobne *zoni pellucidi*, bi lahko bile tudi snovi, ki jih celice sproščajo za pritrdjanje na podlago.

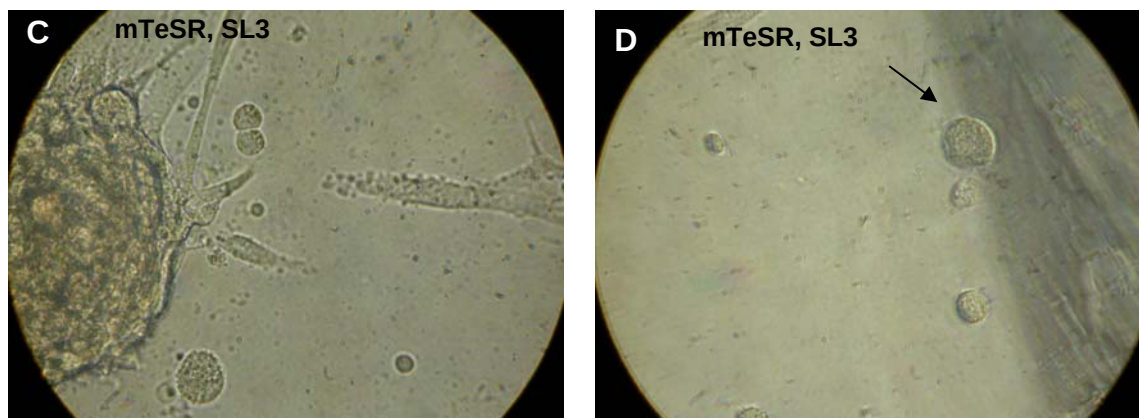


Slika 19: Fotografije celic KM sloja 2 v kulturah tik pred izolacijo RNA po 20 dneh gojenja v mediju MSCGM z dodatkom F in v mediju mTeSR. Na slikah puščice označujejo velike okrogle celice - zgodnjim jajčnim celicam podobne celice (svetlobni mikroskop, povečava 400-krat). Celice so obdane z nekakšnim ovojem (A, D), ki bi lahko bil *zona pellucida*. V mediju mTeSR so se razvile strukture podobne embrioidnim telescem (C).

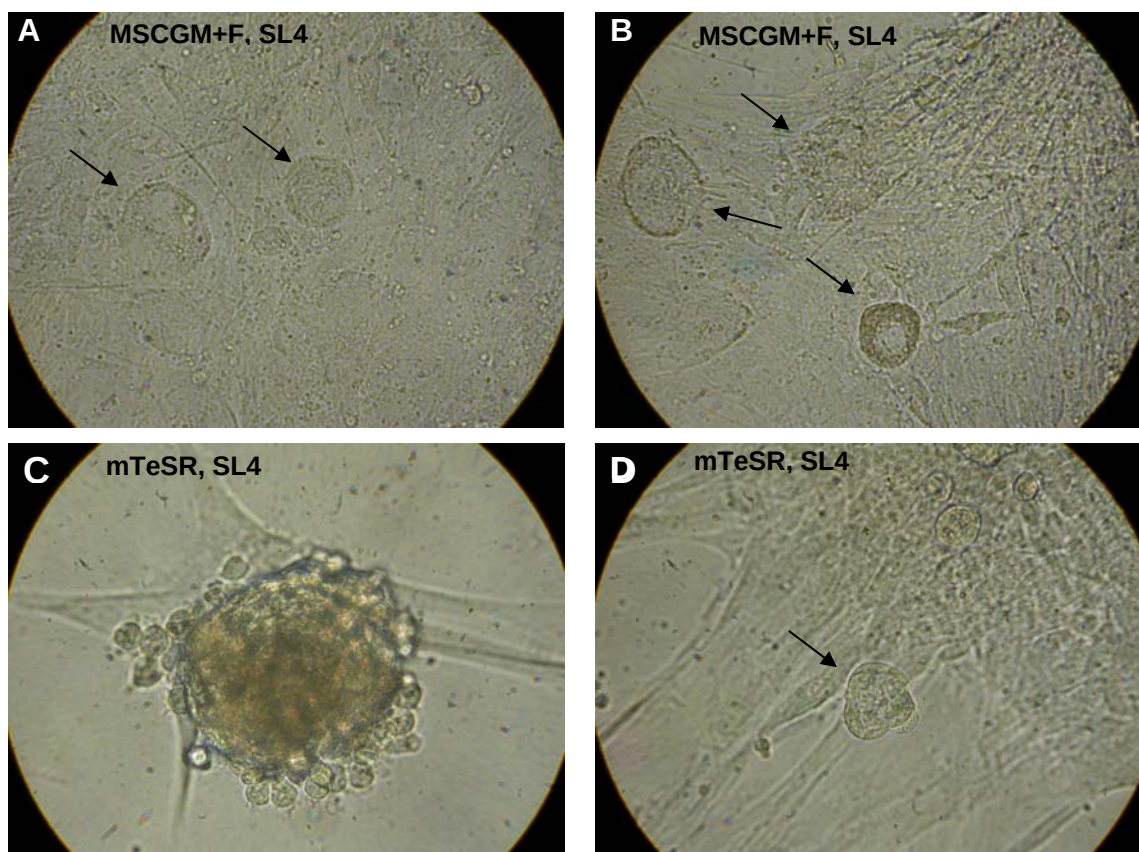


Slika se nadaljuje.

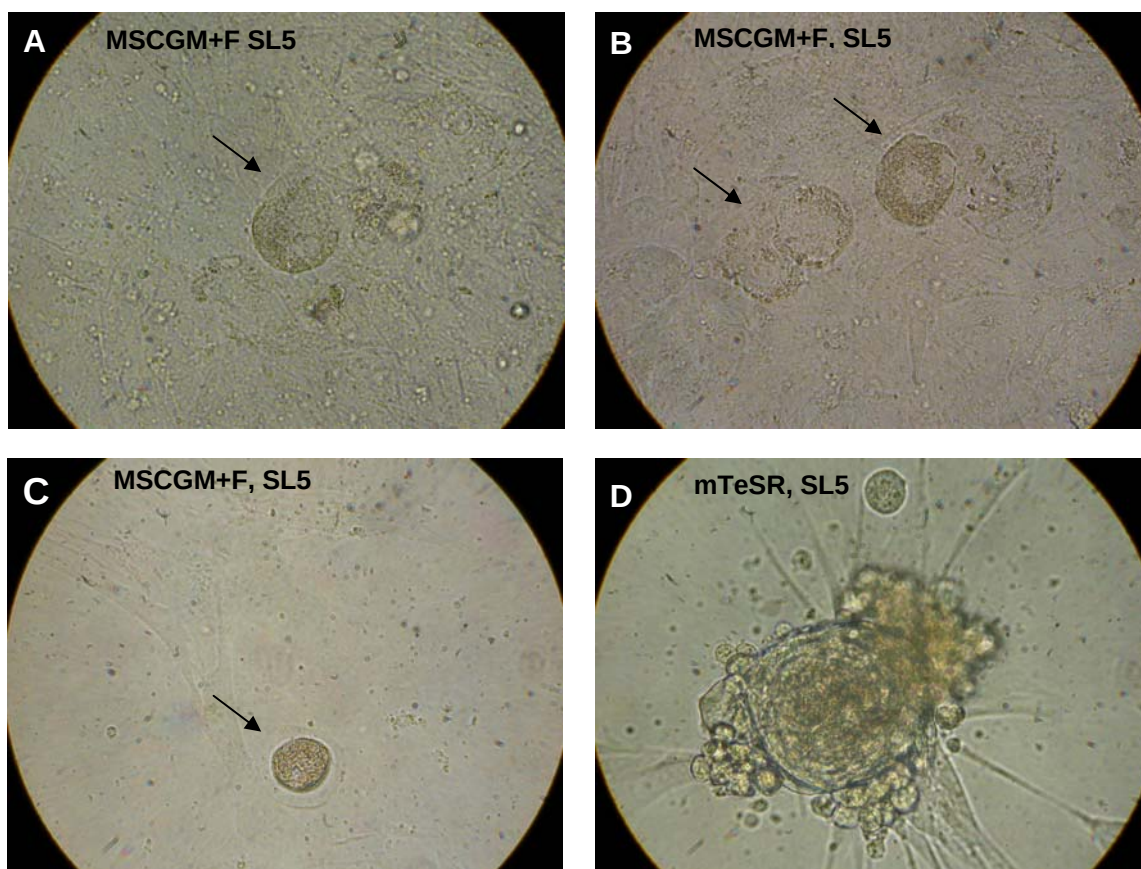
Nadaljevanje.



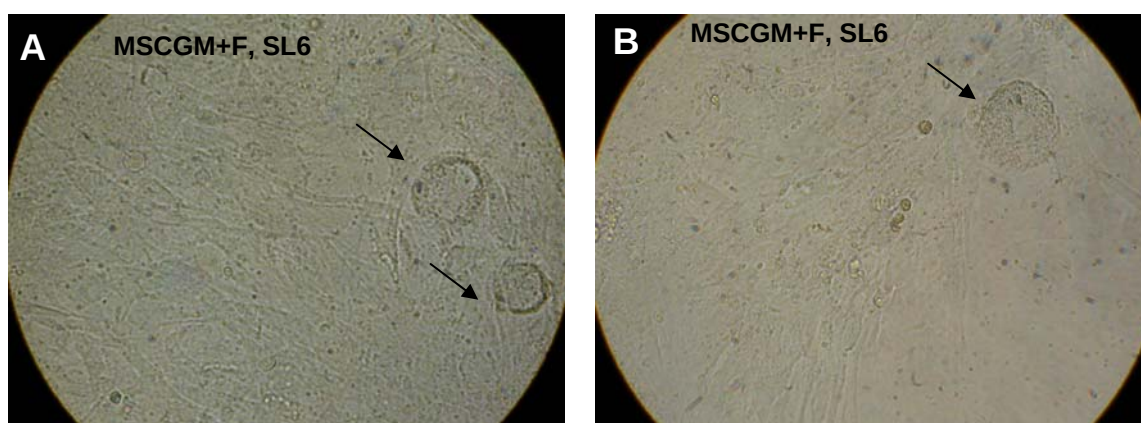
Slika 20: Kultura KM sloj 3 po 20 dneh gojenja v mediju MSCGM z dodatkom F in mediju mTeSR. Na slikah puščice označujejo velike okrogle celice - zgodnjim jajčnim celicam podobne celice (svetlobni mikroskop, povečava 400-krat). Medij MSCGM z dodatkom F (A, B) je imel večji vpliv na oogenezo, v mediju mTeSR (C) pa je prišlo do razvoja struktur podobnih embrioidnim telescem. Vendar so v mediju mTeSR prisotne tudi velike okrogle celice (D), ki pa so manjše kot v mediju MSCGM z dodatkom F.



Slika 21: Kultura KM sloj 4 po 20 dneh gojenja v mediju MSCGM z dodatkom F in mediju mTeSR. Na slikah puščice označujejo velike okrogle celice - zgodnjim jajčnim celicam podobne celice (svetlobni mikroskop, povečava 400-krat). Medij MSCGM z dodatkom F (A, B) je imel večji vpliv na oogenezo, v mediju mTeSR (C, D) pa je prišlo do razvoja struktur podobnih embrioidnim telescem (C) in okroglih celic, ki pa so bile manjše kot pri mediju MSCGM z dodatkom F (D).



Slika 22: Kultura KM sloj 5 po 20 dneh gojenja v mediju MSCGM z dodatkom F in mediju mTeSR. Na slikah puščice označujejo velike okrogle celice - zgodnjim jajčnim celicam podobne celice (svetlobni mikroskop, povečava 400-krat). Medij MSCGM z dodatkom F (A, B, C) je imel večji vpliv na oogenezo, v mediju mTeSR (D) pa je prišlo do razvoja struktur podobnih embrioidnim telescem. V mediju MSCGM z dodatkom F (C) okrogle celice obdaja struktura podobna *zoni pellucidi*.



Slika se nadaljuje.

Nadaljevanje.



Slika 23: Kultura KM sloj 6 po 20 dneh gojenja v mediju MSCGM z dodatkom F in mediju mTeSR. Na slikah puščice označujejo velike okrogle celice - zgodnjim jajčnim celicam podobne celice (svetlobni mikroskop, povečava 400-krat). Medij MSCGM z dodatkom F je imel večji vpliv na oogenezo (A, B) v mediju mTeSR (C) pa je prišlo do razvoja struktur podobnih embrioidnim telescem.

Pričakovali smo, da bomo z ločevanjem na PureSpermu celice ločili po velikosti in se bodo iskane pluripotentne MC, ki so zelo majhne, z velikim jedrom in z malo citoplazme nahajale v spodnji frakciji. Vendar pa smo po testiranju vseh frakcij za embrionalne označevalce dobili le te pozitivne v vseh frakcijah (preglednica 13). Prepostavljamo, da so zgodnje matične celice pritrjene na ostale celice, ki se nahajajo v KM in so zato porazporejene po vseh slojih. Na slikah 24, 25 in 26 so prikazani geli po ločevanju embrionalnih DNA označevalcev v električnem polju.

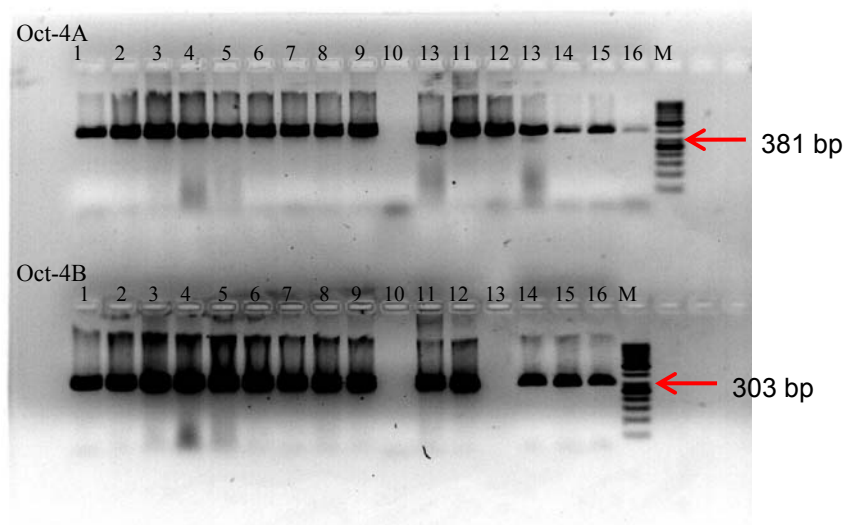
Preglednica 13: Rezultati RT-PCR za embrionalne označevalce na vzorcih KM2

Številka vzorca	Vzorec	Oct-4A in -4B	Sox-2	Nanog	c-kit
Vzorci KM2 odvzeti takoj po izolaciji MNC (brez gojenja celic)					
2	KM2 SL2	++ in +	+	+	+
3	KM2 SL3	++ in ++	+	+	+
4	KM2 SL4	++ in ++	+	+	+
5	KM2 SL5	++ in ++	+	+	+
6	KM2 SL6	++ in ++	+	+	+
Vzorci KM2 odvzeti po 7 dneh gojenja v kulturi					
7	KM2 SL6	++ in ++	+	+	+
8	KM2 SL2	++ in ++	+	+	+
9	KM2 SL3	++ in ++	+	+	+
11	KM2 SL4	++ in ++	+	+	+
12	KM2 SL5	++ in ++	+	+	+
16	Polna kri (poz. kontrola)	+/- in ++	+	+	-
10	Voda (neg. kontrola)	- in -	-	-	-

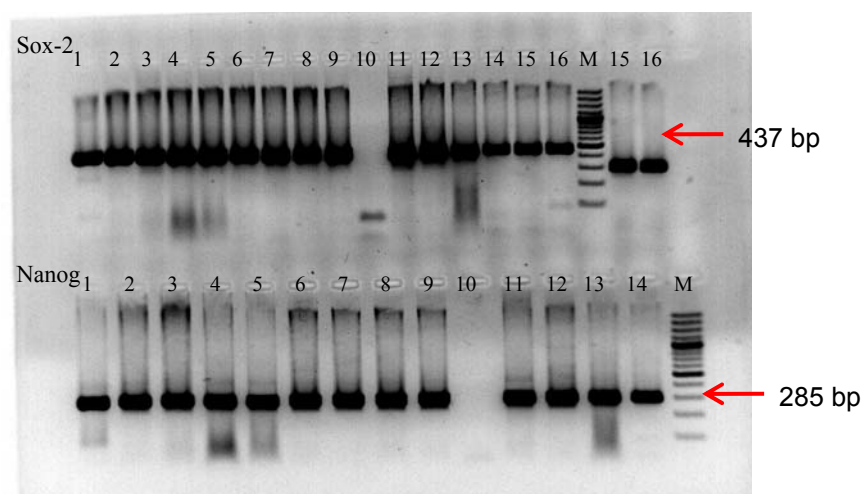
Legenda:

(++) močno pozitiven, (+) pozitivno, (+/-) zelo šibko pozitiven, (-) negativno

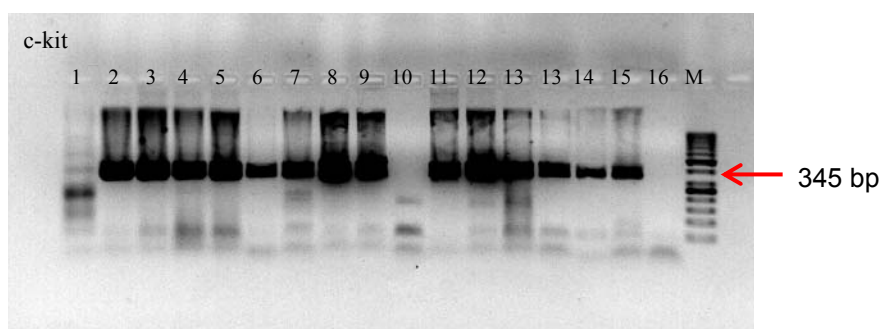
SL – sloj po ločevanju na PureSpermu



Slika 24: Elektroforeza za Oct-4AB, 2% agarozni gel, M = 50 bp (Fermentas). Pričakovana dolžina PCR produktov: Oct-4A 381 bp, Oct-4B 303 bp

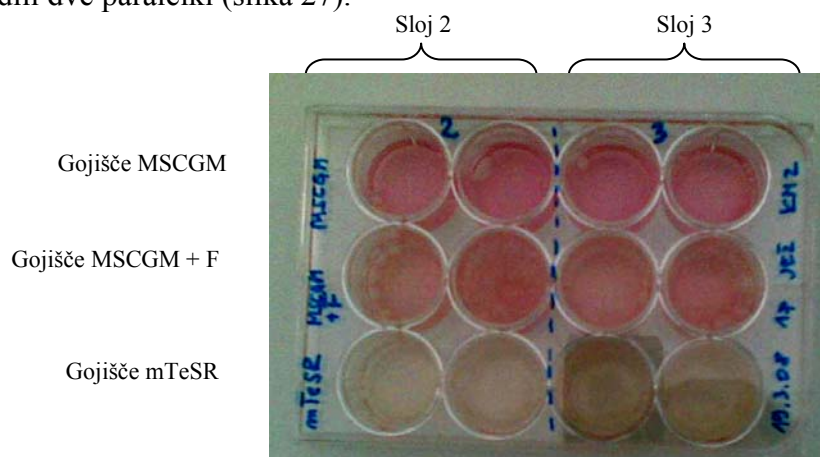


Slika 25: Elektroforeza za Sox-2 in Nanog, 2% agarozni gel, M = 100 bp (Fermentas). Pričakovana dolžina PCR produktov: Sox-2 437 bp, Nanog 285 bp.



Slika 26: Elektroforeza za c-kit, 2% agarozni gel, M = 50 bp (Fermentas). Pričakovana dolžina PCR produkta c-kit: 345 bp.

Poskus smo zasnovali tako, da smo MNC celice iz KM2 (KM2 je pripadal ženski prostovoljki) najprej gojili v kulturi z medijem MSCGM in opazovali kulturo. Po tridesetih dneh gojenja smo celice tripsinizirali in presadili iz posodic v plošče z 12 luknjami. Ločeno smo gojili 5 slojev celic (sloj 2, 3, 4, 5 in 6 – sloj 1 in 7 smo zavrgli, ker v gojilnih posodah ni bilo praktično nič celic), vsak sloj v treh različnih gojiščih, za vsako gojišče pa smo naredili dve paralelki (slika 27).



Slika 27: Gojenje celic v treh različnih gojiščih

Na ploščah z dvanajstimi luknjami smo celice gojili 20 dni in vsake 3-4 dni previdno menjavali medij. Med gojenjem smo celice opazovali pod mikroskopom in iskali velike okrogle celice, ki bi lahko bile različne razvojne stopnje v razvoju jajčne celice. Po 20 dneh gojenja, smo celice postrgali s strgalcem in shranili v mikrocentrifugirkah. Sledila je izolacija RNA in preverjanje ekspresije genov značilnih za jajčno celico z metodo RT-PCR. Rezultati so prikazani v preglednici 14.

Pred gojenjem v treh različnih medijih so bile celice pozitivne za označevalec c-kit in negativne za označevalce oogeneze. Izjema so bile celice sloja 3, ki so bile tudi pred gojenjem pozitivne za označevalec VASA. Pri sloju 2 smo v kulturi sicer opazili velike okrogle celice z RT-PCR pa nismo detektirali izražanja genov značilnih za oogenezo. Celice slojev 4, 5, in 6, ki smo jih gojili v mediju MSCGM z dodatkom F in jim po dvajsetih dneh takega gojenja preverjali ekspresijo genov, značilnih za oogenezo, so bile pozitivne za c-kit, VASA in šibko tudi za SCP3 (označevalec mejoze). Celice sloja 3, 4, 5 in 6, ki smo jih gojili v mediju mTeSR, so po gojenju izražale označevalca c-kit in VASA, ne pa tudi SCP3.

Preglednica 14: Rezultati RT-PCR za označevalce oocit na vzorcih KM2

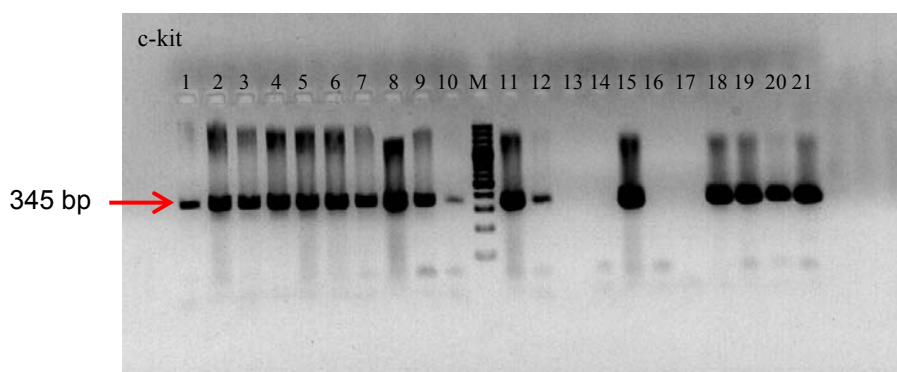
Številka vzorca	Vzorec	c-kit	VASA	SCP3	ZP3	ZP2
KM 2 različnih slojev pred gojenjem v treh različnih medijih						
17	KM2 SL2 M	-	-	-	-	-
18	KM2 SL3 M	++	++	-	-	-
19	KM2 SL4 M	++	-	-	-	-
20	KM2 SL5 M	++	-	-	-	-
KM2 različnih slojev po 20 dneh gojenja v treh različnih medijih						
1	KM2 SL2 M	++	-	-	-	-
2	KM2 SL2 M+F	++	-	-	-	-
3	KM2 SL2 mTeSR	++	-	-	-	-
4	KM2 SL3 M	++	-	-	-	-
5	KM2 SL3 M+F	++	-	-	-	-
6	KM2 SL3 mTeSR	++	+	-	-	-
7	KM2 SL4 M	++	-	-	-	-
8	KM2 SL4 M+F	++	+	+/-	-	-
9	KM2 SL4 mTeSR	++	+/-	-	-	-
10	KM2 SL5 M	+	-	-	-	-
11	KM2 SL5 M+F	++	+/-	+/-	-	-
12	KM2 SL5 mTeSR	++	+	-	-	-
14	KM2 SL6 M	-	-	-	-	-
15	KM2 SL6 M+F	++	+	+	-	-
16	KM2 SL6 mTeSR	-	+/-	-	-	-
13 Voda (negativna kontrola), 21 Znana RNA (pozitivna kontrola)						

Legenda:

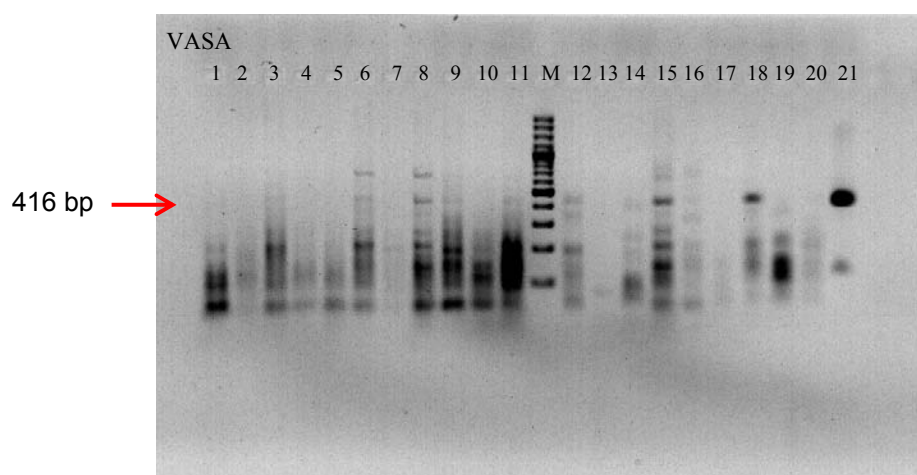
(++) močno pozitiven, (+) pozitivno, (+/-) zelo šibko pozitiven, (-) negativno

SL – sloj po ločevanju na PureSpermu, KM – kostni mozeg, M – MSCGM, M+F – MSCGM z dodatkom F

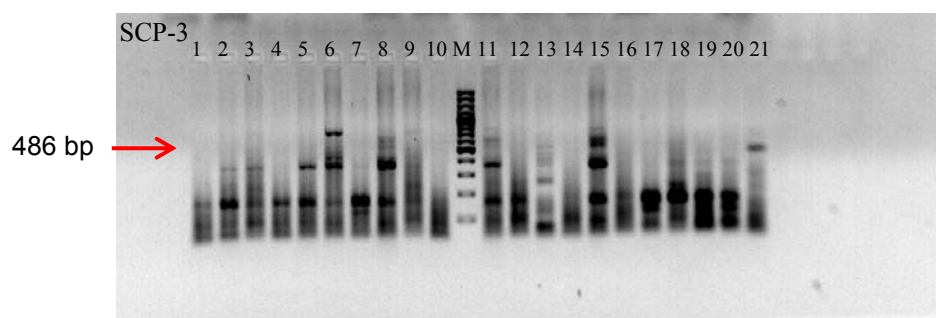
Na slikah 28, 29, 30, 31 in 32 so prikazani geli po ločevanju DNA označevalcev značilnih za jajčne celice v električnem polju.



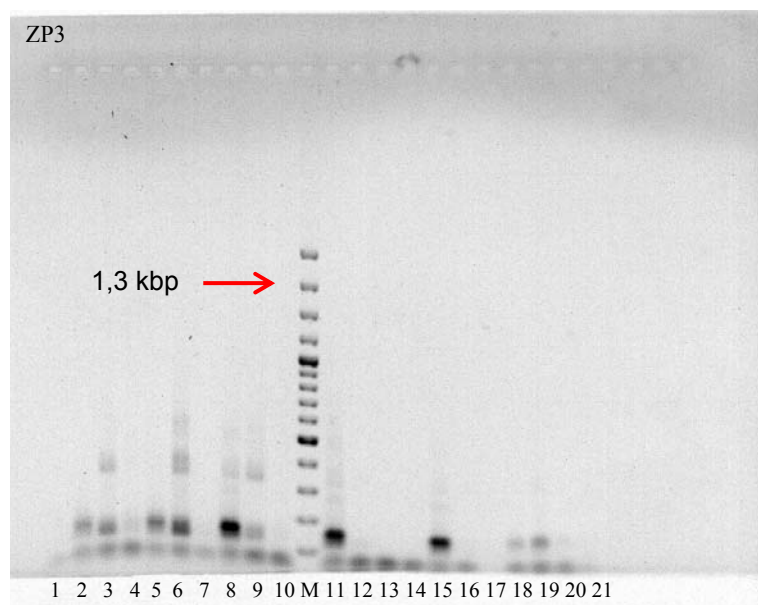
Slika 28: Elektroforeza za c-kit, 2% agarozni gel, M = 100 bp (Fermentas). Pričakovana dolžina PCR produkta c-kit: 345 bp.



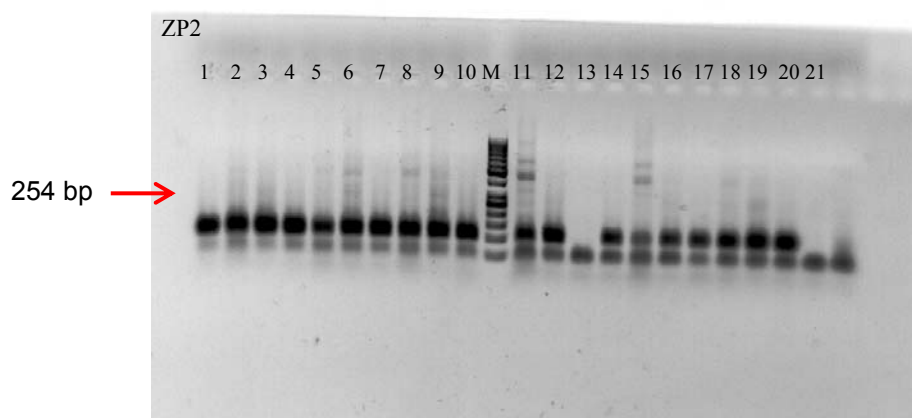
Slika 29: Elektroforeza za VASA, 2% agarozni gel, M = 100 bp (Fermentas).
Pričakovana dolžina PCR produkta VASA: 416 bp.



Slika 30: Elektroforeza za SCP3, 2% agarozni gel, M = 100 bp (Fermentas).
Pričakovana dolžina PCR produkta SCP3: 486 bp.



Slika 31: Elektroforeza za ZP3, 1% agarozni gel, M = 100 bp (Fermentas).
Pričakovana dolžina PCR produkta ZP3: 1,3 kbp.

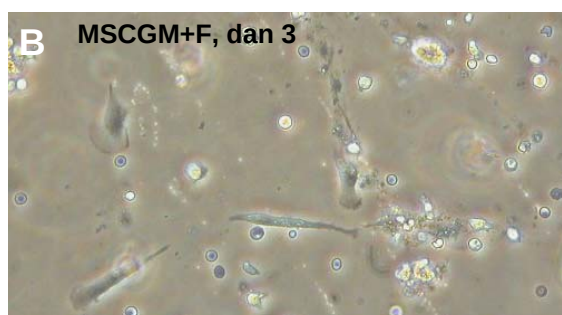
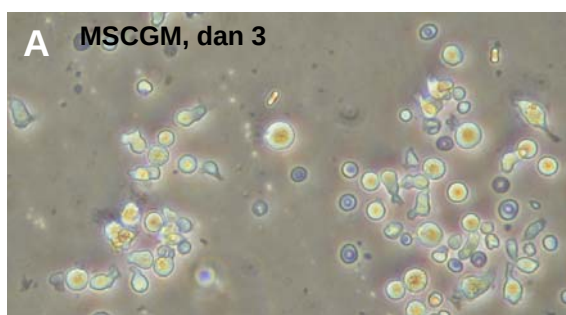


Slika 32: Elektroforeza za ZP2, 2% agarozni gel, M = 50 bp (Fermentas).
Pričakovana dolžina PCR produkta ZP2: 254 bp.

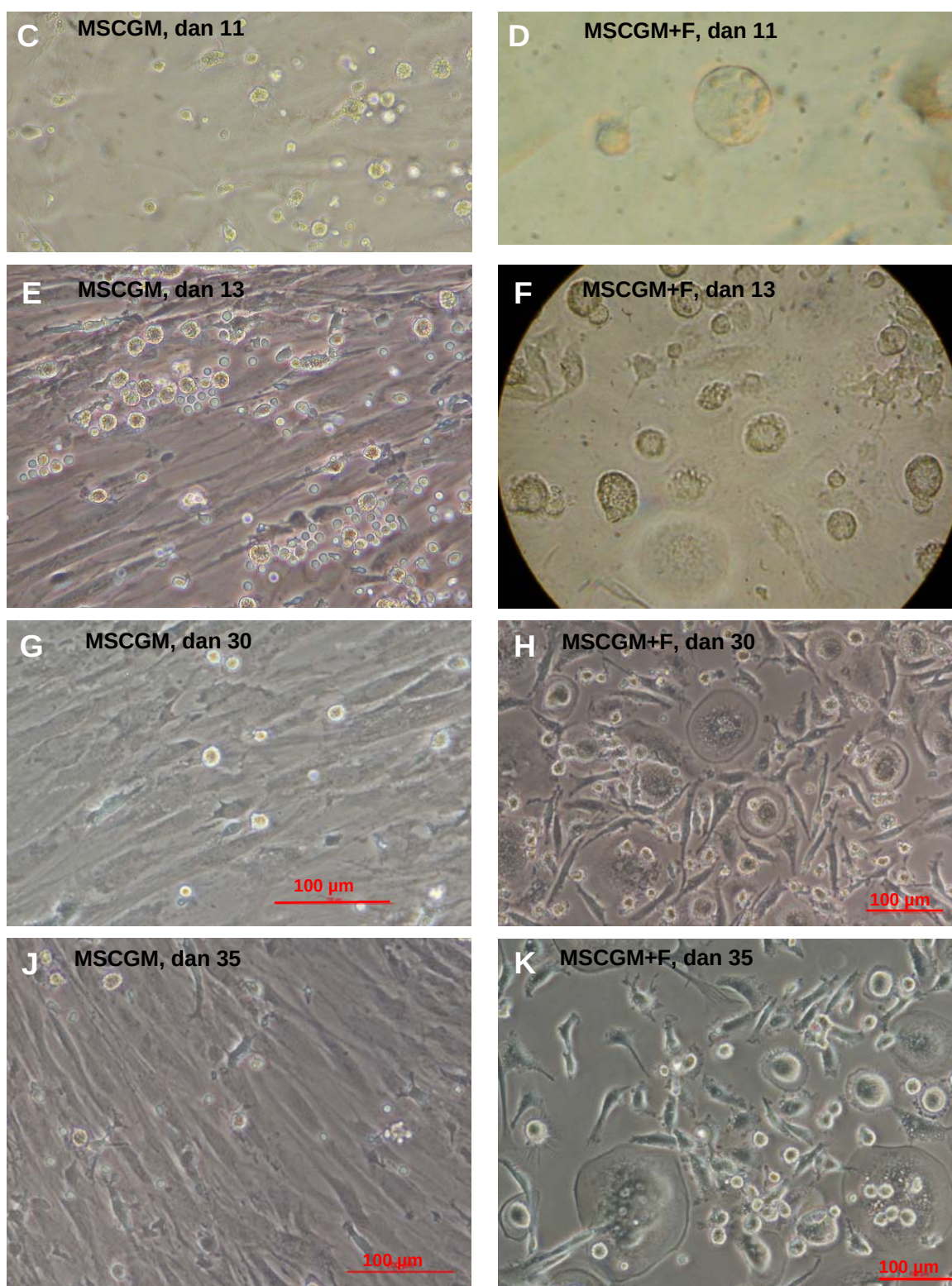
4.3 POSKUS S KOSTNIM MOZGOM PROSTOVOLJCA (KM5)

V tem primeru izoliranih MNC nismo ločevali na PureSpermu, ampak smo jih takoj nasadili v plošče z 12 luknjami. In sicer smo na polovici plošče gojili MNC celice v mediju MSCGM, na drugi polovici pa v mediju MSCGM z dodatkom F. Celice smo gojili 35 dni in pod mikroskopom pozorno spremljali njihovo rast in razvoj.

Tretji dan so se začele celice pritrdjati na površino (slika 33B). Po 13 dneh je opaziti očitno razliko v morfologiji celic (slika 33 E in F), ki se v naslednjih dneh gojenja samo še večja. Celice gojene samo v mediju MSCGM kažejo tipičen fenotip MNC celic iz KM – večinoma so fibroblastne oblike (slika 33 G in J). Celice, gojene z dodatkom F, pa so postajale velike okrogle celice, dosegle so velikost skoraj 100 μm (slika 33 H in K). Pri nekaterih velikih celicah je okoli celice viden nekakšen sloj, ki bi lahko bil *zona pellucida* (slika 33 H in K).

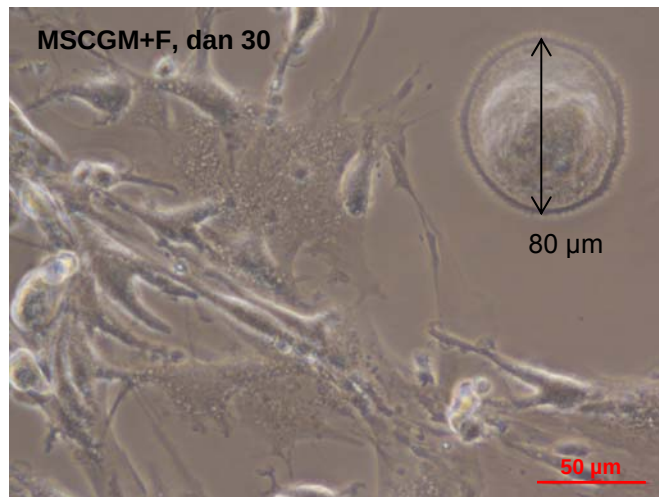


Slika se nadaljuje..



Slika 33: MNC celice izolirane iz KM5 v kulturi fotografirane med 35-dnevnim gojenjem. Levi stolpec (A, C, E, G, J) so MNC celice gojene v mediju MSCGM, celice v desnem stolpcu (B, D, F, H, I, K, L) pa smo gojili v mediju MSCGM z dodatkom F. Vidna je očitna razlika v morfologiji celic po trinajstih dneh gojenja (medij MSCGM fibroblastna oblika in MSCGM z dodatkom F velike okrogle celice). Pri nekaterih velikih celicah je okoli celice viden nekakšen sloj, ki bi lahko bil *zona pellucida* (I, K, L). Svetlobni mikroskop, povečava 200-krat (B, E, G, H, I, J, K, L), 400-krat (A, C, D, F).

Po tridesetih dneh gojenja smo v kulturi z medijem MSCGM z dodatkom F opazili tudi zelo veliko okroglo celico s premerom 80 μm (slika 34, primerjaj s sliko 9D).



Slika 34: Velika okrogla celica v kulturi KM5, svetlobni mikroskop, povečava 200-krat.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

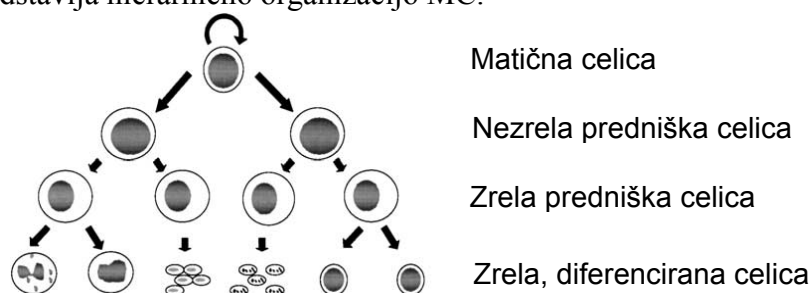
Kot kaže, se v KM nahajajo prekursorske MC, saj so kulture celic MNC izražale označevalce pluripotentnosti (Oct-A, Oct-B, Sox-2, Nanog, c-kit, preglednica 13). Po ločevanju MNC celic na PureSpermu, smo dobili sedem slojev, ki so vsi izražali označevalce pluripotentnosti, kljub temu, da smo pričakovali, da bo vsaj kakšen izmed slojev negativen. Po opazovanju celic v kulturi smo opazili, da se celice, za katere predpostavljamo, da so iskane zgodnje MC, vedno nahajajo v bližini drugih celic iz KM, zato predvidevamo, da so nanje nekako pritrjene. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi drugi raziskovalci (Kucia in sod., 2008a).

Dokaz za obstoj pluripotentnih celic v KM je razvoj v zgodnjim jajčnim celicam podobne celice. Ko smo MNC, izolirane iz KM, nasadili v ustrezno gojišče, se je pokazal njihov potencial, saj so razvile v oocyte (germinalno linijo). Dokaz za to so germinalni označevalci (c-kit, VASA, SCP3, preglednica 14) in oocitom podobne velike okrogle celice v kulturi. Morebitni dokaz je nastanek embrioidnih telesc. Zanimivo bi bilo tudi vedeti kakšen je kariotip teh celic in posledično potencialnih embrioidnih telesc.

Odkritja različnih vrst MC v KM postavljajo pod vprašaj do zdaj veljaven koncept plastičnosti MC.

5.1 STARI MODEL MATIČNIH CELIC

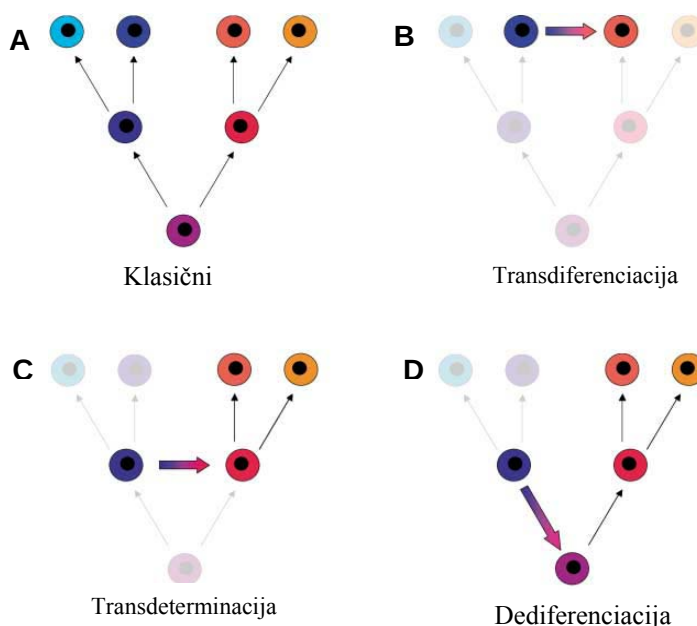
Z opazovanjem sprememb v populaciji celic *in vivo* in *in vitro* so strokovnjaki prišli do spoznanj, da celice v embriu in v odraslem osebku dosežejo stanje, v katerem so popolnoma diferencirane in optimalno opravljajo svojo funkcijo. To stanje naj bi bilo dokončno in ireverzibilno, naslednji korak je programirana celična smrt (apoptoza). Tukaj se je torej postavljalo vprašanje, kako se nadomestijo propadle celice. Po prevladujoči teoriji vsako tkivo vsebuje majhno populacijo MC, ki imajo sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije. To teorijo je še potrdila izolacija multipotentnih KMC, ki se kot maloštevilna populacija nahajajo v KM odraslega osebka. Poleg KM, so maloštevilčno populacijo multipotentnih celic, našli še v koži, živčnem sistemu, pankreasu, srcu, jetrih in tudi v drugih tkivih (Zipori, 2005). Izolirane KMC se diferencirajo v usmerjene predniške celice, ki so v svojem razvoju omejene na eno samo linijo celic znotraj krvotvornega sistema (mieloidna, eritroidna, megakariocitna in limfocitna linija). Potomkam predniških celic se z dozorevanjem in diferenciacijo potentnost zmanjšuje. Zaporedje faz v razvoju od zgodnjih MC do diferenciranih celic imenujemo drevo MC, ki glede na potentnost celic predstavlja hierarhično organizacijo MC.



Slika 35: Hierarhična organizacija sistema MC (Mayani, 2003).

Na vrhu je multipotentna MC, veje pa predstavljajo vedno bolj diferencirane stopnje celic. Razvoj celic poteka samo v eno smer – od manj diferenciranih k bolj diferenciranim.

Podatki pridobljeni v zadnjih letih nasprotujejo zgoraj opisanemu in trenutno veljavnemu modelu MC. Alternativni modeli predlagajo, da lahko celice reverzibilno pridobijo lastnosti MC (Zipori, 2005), torej da se dediferencirajo ali pa preskakujejo iz ene v drugo embrionalno plast (plastičnost).



Slika 36: Predlagan model razvoja MC in dogodki, ki naj bi bili odgovorni za njihovo plastičnost. (A) Pri klasičnem modelu se z dozorevanjem in diferenciacijo celicam potentnost zmanjšuje. Na dnu drevesa je MC z največjo potentnostjo, veje pa predstavljajo vedno bolj diferencirane stopnje celic. Pomembno je, da razvoj celic poteka samo v eno smer – od manj diferenciranih k bolj diferenciranim. (B, C, D) Trije različni načini kako lahko celice preskočijo med linijami. (B) Pojem transdiferenciacija pa opisuje ireverzibilno diferenciacijo že diferencirane celice v neko drugo diferencirano celico. (C) Transdeterminacija je podoben pojav kot transdiferenciacija, le da do preskoka med linijami pride pri predniških celicah in ne pri končno diferenciranih celicah. Predniška celica torej preskoči iz ene linije v drugo in nato generira diferencirane celice te druge linije. (D) Najprej pride do dediferenciacije celice do skupne MC z večjo potentnostjo, nato pa se celica diferencira v drugo celično linijo (Frisen, 2002).

Mnoge *in vivo* študije so pokazale, da imajo odrasle MC sposobnost diferenciacije tudi v celice drugih tkiv in ne samo v celice tkiva iz katerega izhajajo. To sposobnost imenujemo plastičnost MC. Pojem transdiferenciacija pa opisuje ireverzibilno diferenciacijo že diferencirane celice v neko drugo diferencirano celico. Če ta dognanja držijo, potem so odrasle MC po svoji potentnosti zelo podobne EMC, saj zaradi plastičnosti lahko diferencirajo v praktično vse tipe celic in imajo torej zelo široko terapevtsko uporabnost (Vieyra in sod., 2005). Tudi KMC naj bi imele sposobnost diferenciacije v celice mnogih organov (srce, možgani, jetra ali pankreas). Vendar pa nato mnogi strokovnjaki niso mogli dokazati plastičnosti KMC (Frisen, 2002; Murry in sod., 2004; Nygren in sod., 2004; Wagers in sod., 2002; Wagers in Weissman, 2004), zato se je pojavilo mnogo alternativnih razlag prejšnjih podatkov, ki so podpirali plastičnost KMC. Zato številni drugi

strokovnjaki ne podpirajo koncepta plastičnosti in transdiferenciacije (Beltrami in sod., 2007; Kucia in sod., 2006a; Vieyra in sod., 2005; Zipori, 2005). Prvi alternativni koncept je razlagal plastičnost MC s fenomenom celične fuzije. Transplantirane KMC naj bi se zlele z diferenciranimi celicami prejemnika in tako naj bi nastale hčerinske celice, ki imajo dvojno število kromosomov in izražajo citoplazmatske in površinske označevalce, ki izhajajo iz obeh starševskih celic (Frisen, 2002). Druga razlaga plastičnosti MC temelji na možnosti epigenetskih sprememb v celicah, ki so izpostavljene določenim zunanjim signalom (npr. poškodbi organa). Oba dogodka – fuzija celic in nastanek epigenetskih sprememb – se zgodita naključno in zelo poredko, zato z njima težko razložimo podatke, ki so podpirali transdiferenciacijo in plastičnost. Tretja alternativna možnost, ki bi lahko nadomestila razlago s plastičnostjo MC pa je, da KM vsebuje heterogeno populacijo MC z različno potentnostjo. Zadnja možnost se nam zdi najbolj verjetna, podpirajo pa jo tudi drugi raziskovalci (Frisen, 2002; Kucia in sod., 2006a).

5.2 PRIHODNJE DELO

V prihodnosti bo potrebno preveriti ali se tudi v periferni krvi nahajajo embrionalne matične celice odraslega in dokazati njihovo uniformnost v vseh organih.

Z nadaljnjim delom bo potrebno identificirati celice, na katere se pritrjajo zgodnje MC iz KM (identifikacija njihove niše). Koristno bi bilo tudi ugotoviti, katere molekule so tiste, ki omogočajo povezavo, saj bo to znanje zelo pomembno za učinkovito izolacijo zgodnjih MC iz KM. V naših kulturah so se razvile strukture podobne embrioidnim telescem, kar je morebitni dokaz za pluripotentnost proučevanih celic. V naslednjih raziskavah bo zato potrebno dokazati, da vsebujejo celice v embrioidnih telescih označevalce vseh treh embrionalnih plasti in da se lahko v te tri plasti razvijejo tudi *in vivo* v modelu SCID miške.

Naše raziskave vodijo v nove, bolj k aplikacijam v celični terapiji usmerjene raziskave, ki bodo omogočile prenos znanja o embrionalnih metičnih celicah v uporabo v medicini.

6 POVZETEK

V človekovem telesu se nahaja posebna vrsta celic, ki jo ohranjamo v sebi vse življenje in ki nam omogoča, da se naša tkiva in organi obnavljajo kljub številnim poškodbam in okvaram, do katerih prihaja v vsakdanjem življenju. Te celice imenujemo matične celice. MC so zelo redke, še največ jih je v kostnem mozgu. Sposobne so dolgotrajnega asimetričnega deljenja in tvorbe sebi identičnih kopij ter diferenciacije v bolj usmerjene tkivne celice. Pomembna lastnost MC je tudi plastičnost – sposobnost odraslih MC, da se diferencirajo tudi v celice drugih tkiv in ne samo v celice tkiva iz katerega izhajajo.

Za razvoj znanosti na področju MC so zelo pomembne raziskave in izkušnje s področja hematologije in presaditev KM. Novo poglavje v humani biologiji in medicini je bilo odkritje embrionalnih matičnih celic. Iz mišjih zarodkov sta jih prva izolirala Martin Evans in Matthew Kaufman leta 1981, istočasno pa jih je neodvisno izolirala tudi Gail R. Martin, ki je tudi prva uporabila izraz embrionalna matična celica.

Kot kaže, se v KM nahajajo populacija zgodnjih MC, saj so naše kulture celic MNC iz KM izražale označevalce pluripotentnosti (Oct-A, Oct-B, Sox-2, Nanog, c-kit). Po pridobivanju vzorcev kostnega mozga zdravih preiskovancev smo najprej izolirali mononuklearne celice z gradientnim centrifugiranjem, pri čemer smo dobili različne plasti. Zanimivo je, da smo po ločevanju MNC celic na PureSpermu, dobili sedem slojev, ki so vsi izražali označevalce pluripotentnosti. Predpostavljamo, da je razlog za to, da so iskane zgodnje MC pritrjene na ostale celice, ki se nahajajo v KM in se zato razporedijo po vseh slojih. Nato smo različne plasti izoliranih mononuklearnih celic gojili v treh različnih gojiščih ob dodatkih rastnih dejavnikov, kot sta bFGF in TGF β ter folikularna tekočina. Po dvajsetdnevem gojenju, med katerim smo pozorno spremljali morfolologijo celic, smo iz kultur, izolirali skupno RNA in z metodo RT-PCR preverili ekspresijo germinalnih označevalcev (c-kit, SCP3, VASA, ZP2 in ZP3). V kulturi, kjer smo celice gojili v mediju z dodatkom folikularne tekočine, so se razvile velike okrogle celice (80 μ m). Ko smo MNC, izolirane iz KM, nasadili v ustrezno gojišče, se je pokazal njihov potencial, saj so razvile v oocyte (germinalno linijo). Dokaz za to so germinalni označevalci (c-kit, VASA, SCP3) in oocitom podobne velike okrogle celice v kulturi. Morebitni dokaz je nastanek embrioidnih teles. Dobljeni rezultati potrjujejo, da se v kostnem mozgu odraslih oseb nahaja populacija matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi, ki je sposobna nadaljne diferenciacije.

V prihodnosti nas čaka še veliko dela na področju identifikacije zgodnjih matičnih celic in razvoj metod za njihovo uspešno gojenje in namnoževanje. Predvidevamo, da bodo v prihodnosti te celice dober vir matičnih celic za uporabo v celičnih terapijah in regenerativni medicini.

7 VIRI

- Altman J. 1962. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135: 1127-1128
- Andrews P. W., Matin M. M., Bahrami A. R., Damjanov I., Gokhale P., Draper J. S. 2005. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochemical Society Transactions*, 33, 6: 1526-1530
- Aoi T., Yae K., Nakagawa M., Ichisaka T., Okita K., Takahashi K., Chiba T., Yamanaka S. 2008. Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. *Science*, 1, 321(5889):699-702
- Atkinson K. 2004. Clinical bone marrow and blood stem cell transplantations. 3rd edn, Press Syndicate of the University of Cambridge: 876 str.
- Beltrami A. P., Cesselli D., Bergamin N., Marcon P., Rigo S., Puppato E., D'Aurizio F., Verardo R., Piazza S., Pignatelli A., Poz A., Baccarani U., Damiani D., Fanin R., Mariuzzi L., Finato N., Masolini P., Burelli S., Belluzzi O., Schneider C., Beltrami C. A. 2007. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood*, 110, 9: 3438-3446
- Bohinjec J. 1983. Temelji klinične hematologije. 1. izdaja, Ljubljana, Dopisna delavska univerza UNIVERZUM: 190 str.
- Bongso A., Richards M. 2004. History and perspective of stem cell research. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 18, 6: 827-842
- Buhring H. J., Battula V. L., Treml S., Schewe B., Kanz L., Vogel, W. 2007. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Annals of the New York Academy of Science*, 1106: 262-271
- Cyranoski D. 2007. Simple switch turns cells embryonic. *Nature*, 447,7145: 618-619
- D'Ippolito G., Diabira S., Howard G. A., Menei P., Roos B. A., Schiller P. C. 2004. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *Journal of Cell Science*, 117, 14: 2971-2981
- D'Ippolito G., Howard G. A., Roos B. A., Schiller P. C. 2006. Isolation and characterization of marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells. *Experimental Hematology*, 34, 11: 1608-1610
- Dawn B., Tiwari S., Kucia M. J., Zuba-Surma E. K., Guo Y., Sanganalmath S. K., Abdel-Latif A., Hunt G., Vincent R. J., Taher H., Reed N. J., Ratajczak M. Z., Bolli R. 2008. Transplantation of bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells attenuates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Stem Cells*, 26, 6: 1646-1655

- De Carlos J. A. Borrell J. 2007. A historical reflection of the contributions of Cajal and Golgi to the foundations of neuroscience. *Brain Research Review*, 55, 1: 8-16
- De Coppi P., Bartsch G., Jr., Siddiqui M. M., Xu T., Santos C. C., Perin L., Mostoslavsky G., Serre A. C., Snyder E. Y., Yoo J. J., Furth M. E., Soker S., Atala A. 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, 25, 1: 100-106
- Docheva D., Popov C., Mutschler W., Schieker M. 2007. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11, 1: 21-38
- DDX4 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 [*Homo sapiens*], GeneID: 54514. 2008. ENZTREZ Gene (27. 7. 2008)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=6657&ordinalpos=5&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum (5. 6. 2008)
- Edling C. E. Hallberg B. 2007. c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 11: 1995-1998
- Ende M. Ende N. 1972. Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. A new method. *Va. Med. Mon. (1918.)*, 99, 3: 276-280
- Evans M. J., Kaufman M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 5819: 154-156
- Friel R., Van der, S. S., Mee P. J. 2005. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. *Advance Drug Delivery Reviews*, 57, 13: 1894-1903
- Frisen J. 2002. Stem cell plasticity? *Neuron*, 35, 3: 415-418
- Gatti R. A., Meuwissen H. J., Allen H. D., Hong R., Good, R. A. 1968. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet*, 2, 7583: 1366-1369
- GE Healthcare. Isolation of mononuclear cells, methodology and applications. 2005. GE Healthcare. Ref Type: Catalog
- Hwang W. S., Roh S. I., Lee B. C., Kang S. K., Kwon D. K., Kim S., Kim S. J., Park S. W., Kwon H. S., Lee C. K., Lee J. B., Kim J. M., Ahn C., Paek S. H., Chang S. S., Koo J. J., Yoon H. S., Hwang J. H., Hwang Y. Y., Park Y. S., Oh S. K., Kim H. S., Park J. H., Moon S. Y., Schatten G. 2005. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science*, 308, 5729: 1777-1783
- Hwang W. S., Ryu Y. J., Park J. H., Park E. S., Lee E. G., Koo J. M., Jeon H. Y., Lee B. C., Kang S. K., Kim S. J., Ahn C., Hwang J. H., Park K. Y., Cibelli J. B., Moon S. Y.

2004. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*, 303, 5664: 1669-1674
- 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 L. O., Simmons E. L., Marks E. K., Eldredge J. H. 1951. Recovery from radiation injury. *Science*, 113, 2940: 510-511
- Jauch R., Ng C. K., Saikatendu K. S., Stevens R. C., Kolatkar P. R. 2008. Crystal structure and DNA binding of the homeodomain of the stem cell transcription factor Nanog. *Journal of Molecular Biology*, 376, 3: 758-770
- Jiang Y., Vaessen B., Lenvik T., Blackstad M., Reyes M., Verfaillie C. M. 2002. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Experimental Hematology*, 30, 8: 896-904
- Kiel M. J., Morrison S. J. 2008. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nature Reviews Immunology*, 8, 4: 290-301
- Kolf C. M., Cho E., Tuan R. S. 2007. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research and Therapy*, 9, 1: 204
- Kucia M., Wu W., Ratajczak M. Z. 2007. Bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells: their developmental origin and biological significance, *Development and Dynamics*, 236, 12: 3309-3320
- Kucia M., Reca R., Campbell F. R., Zuba-Surma E., Majka M., Ratajczak J., Ratajczak M. Z. 2006a. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, 20, 5: 857-869
- Kucia M., Zuba-Surma E., Wysoczynski M., Dobrowolska H., Reca R., Ratajczak J., Ratajczak M. Z. 2006b. Physiological and pathological consequences of identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in adult bone marrow. *Journal Physiology and Pharmacology*, 57, 5: 5-18
- Kucia M., Halasa M., Wysoczynski M., Baskiewicz-Masiuk M., Moldenhawer S., Zuba-Surma E., Czajka R., Wojakowski W., Machalinski B., Ratajczak M. Z. 2007a. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia*, 21, 2: 297-303
- Kucia M., Zuba-Surma E. K., Wysoczynski M., Wu W., Ratajczak J., Machalinski B., Ratajczak M. Z. 2007b. Adult marrow-derived very small embryonic-like stem cells and tissue engineering. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7, 10: 1499-1514

- Kucia M., Wysoczynski M., Ratajczak J., Ratajczak M. Z. 2008a. Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell and Tissue Research*, 331, 1: 125-134
- Kucia M., Wysoczynski M., Ratajczak J., Ratajczak M. Z. 2008b. Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell and Tissue Research*, 331, 1: 125-134
- Lefievre L., Conner S. J., Salpekar A., Olufowobi O., Ashton P., Pavlovic B., Lenton W., Afnan M., Brewis I. A., Monk M., Hughes D. C., Barratt C. L. 2004. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reproduction*, 19, 7: 1580-1586
- 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? *Haematologica*, 92, 7: 872-877
- Martin G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78, 12: 7634-7638
- Mayani H. 2003. A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Archives of Medical Research* 34, 1: 3-15
- McGuckin C. P., Forraz N., Baradez M. O., Navran S., Zhao J., Urban R., Tilton R., Denner L. 2005. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Proliferation*, 38, 4: pp. 245-255
- Meng X., Ichim T. E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K. W., Thebaud B., Riordan N. H. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine*, 5: 57
- Mitalipov S. M., Zhou Q., Byrne J. A., Ji W. Z., Norgren R. B., Wolf D. P. 2007. Reprogramming following somatic cell nuclear transfer in primates is dependent upon nuclear remodeling. *Human Reproduction*, 22, 8: 2232-2242
- Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher L. W., Robey P. G., Shi S. 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 10: 5807-5812
- Morris M. B., Rathjen J., Keough R., Rathjen P. D. 2005. Biology of embryonic stem cells, in human embryonic stem cells. J. Odorico, S.-C. Zhang, R. Pedersen (eds). BIOS Scientific Publishers, 391 str.
- Murry C. E., Soonpaa M. H., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H. O., Rubart M., Pasumarthi K. B., Virag J. I., Bartelmez S. H., Poppa V., Bradford G., Dowell J. D., Williams D. A., Field L. J. 2004. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 428, 6983: 664-668

- Nygren J. M., Jovinge S., Breitbach M., Sawen P., Roll W., Hescheler J., Taneera J., Fleischmann B. K., Jacobsen S. E. 2004. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature Medicine*, 10, 5: 494-501
- Oertel M. Shafritz D. A. 2008. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1782, 2: 61-74
- Ratajczak M. Z., Machalinski B., Wojakowski W., Ratajczak J., Kucia M. 2007a. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia*, 21, 5: 860-867
- Ratajczak M. Z., Zuba-Surma E. K., Machalinski B., Kucia, M. 2007b. Bone-marrow-derived stem cells--our key to longevity? *Journal of Applied Genetics*, 48, 4: 307-319
- Ratajczak M. Z., Zuba-Surma E. K., Machalinski B., Ratajczak J., Kucia M. 2008a. Very Small Embryonic-Like (VSEL) Stem Cells: Purification from Adult Organs, Characterization, and Biological Significance. *Stem Cell Review*, 4, 2: 89-99
- Ratajczak M. Z., Zuba-Surma E. K., Wysoczynski M., Ratajczak J., Kucia M. 2008b. Very small embryonic-like stem cells: characterization, developmental origin, and biological significance. *Experimental Hematology*, 36, 6: 742-751
- Reyes M., Li S., Foraker J., Kimura E., Chamberlain J. S. 2005. Donor origin of multipotent adult progenitor cells in radiation chimeras. *Blood*, 106, 10: 3646-3649
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C. M. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98, 9: 2615-2625
- Ribatti D. 2007. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. *Leukemia Research*, 31, 4: 439-444
- Schofield R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4, 1-2: 7-25
- Schwartz R. E. Verfaillie, C. 2005. Adult stem cell plasticity, in *Human Embryonic Stem Cells*. Uredniki: J. Odorico, S.-C. Zhang, R. Pedersen, BIOS Scientific Publishers, pp. 45-55
- Serafini M., Dylla S. J., Oki M., Heremans Y., Tolar J., Jiang Y., Buckley S. M., Pelacho B., Burns T. C., Frommer S., Rossi D. J., Bryder D., Panoskaltsis-Mortari A., O'Shaughnessy M. J., Nelson-Holte M., Fine G. C., Weissman I. L., Blazar B. R., Verfaillie C. M. 2007. Hematopoietic reconstitution by multipotent adult progenitor cells: precursors to long-term hematopoietic stem cells. *Journal of Experimental Medicine*, 204, 1: 129-139
- Shamblott M. J., Axelman J., Wang S., Bugg E. M., Littlefield J. W., Donovan P. J., Blumenthal P. D., Huggins G. R., Gearhart J. D. 1998. Derivation of pluripotent stem

- cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 23: 13726-13731
- Siminovitch L., McCulloch E. A., Till J. E. 1963. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *Journal of Cell Physiology*, 62: 327-336
- SOX2 SRY (sex determining region Y)-box 2 [*Homo sapiens*], GeneID: 6657. 2008.
ENZTREZ Gene (27. 7. 2008)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=6657&ordinalpos=5&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum (5. 6. 2008)
- Stojkovic M., Stojkovic P., Leary C., Hall V. J., Armstrong L., Herbert M., Nesbitt M., Lako M., Murdoch A. 2005. Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*, 11, 2: 226-231
- Strbad M. 2004. Osamitev in opredelitev človeških matičnih celic iz kostnega mozga, diplomsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, biotehniška fakulteta, 77 str.
- Strbad M., Rožman, P. 2005. Uporaba matičnih celic v medicini. *Proteus*, 67, 8: 340-348
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 5: 861-872
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 4: 663-676
- Takeda J., Seino S., Bell G. I. 1992. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues, *Nucleic Acids Research*, 20, 17: 4613-4620
- Thomas E. D., Lochte H. L., Jr., Lu, W. C., Ferrebee J. W. 1957. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 257, 11: 491-496
- Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 5391: 1145-1147
- The Nobel prize in physiology or medicine. 2007. (1. 2. 2008).
http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/index.html (5. 6. 2008)
- Till J. E., McCulloch, E. A. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research*, 14: 213-222
- Verfaillie C. M. 2005. Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis. Found. Symp.*, 265: 55-61

- Vieyra D. S., Jackson K. A., Goodell M. A. 2005. Plasticity and tissue regenerative potential of bone marrow-derived cells. *Stem Cell Review*, 1, 1: 65-69
- Virant-Klun I., Rozman P., Cvjeticanin B., Vrtacnik-Bokal E., Novakovic S., Ruelicke T., Dovč P., Meden-Vrtovec H. 2008a. Parthenogenetic Embryo-Like Structures in the Human Ovarian Surface Epithelium Cell Culture in Postmenopausal Women with No Naturally Present Follicles and Oocytes. *Stem Cells and Development*, v tisku.
- Virant-Klun I., Zech N., Rozman P., Vogler A., Cvjeticanin B., Klemenc P., Malicev E., Meden-Vrtovec H. 2008b. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation*, v tisku.
- Wagers A. J., Sherwood R. I., Christensen J. L., Weissman I. L. 2002. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*, 297, 5590: 2256-2259
- Wagers A. J. Weissman I. L. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116, 5: 639-648
- Wassarman P. M., Jovine L., Litscher E. S., Qi H., Williams Z. 2004. Egg-sperm interactions at fertilization in mammals. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 115, 1: S57-S60
- Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I. I., Thomson J. A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 5858: 1917-1920
- Yuan L., Liu J. G., Zhao J., Brundell E., Daneholt B., Hoog C. 2000. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Molecular Cell*, 5, 1: 73-83
- Zipori D. 2005. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells*, 23, 6: 719-726

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju doc. Miomirju Kneževiču, ki me je navdušil za delo v celičnem laboratoriju.

Somentorju in delovnemu mentorju, doc. dr. Primožu Rožmanu, se najlepše zahvaljujem za zaupanje, posredovanje dragocenega znanja, nasvete, spodbude in neposreno pomoč pri izdelavi naloge. Zelo uspešno mu je uspelo navdušenje in zanimanje za matične celice prenesti tudi name.

Zahvala gre tudi recenzentu prof. dr. Petru Dovču in somentorju doc. dr. Primožu Rožmanu za strokovni pregled naloge.

Zahvaljujem se tudi Zavodu RS za transfuzijsko medicino, ki mi je finančno omogočil izvedbo raziskave.

Posebno hvaležna sem tudi Tanji Telebak, Poloni Klemenc, Markotu Strbadu in Elviri Maličev za nasvete in pomoč pri gojenju celic in eksperimentalnem delu. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, saj so mi bili vsi vedno pripravljeni prisokočiti na pomoč. Hvaležna sem tudi Nadji Polanc in ostalim iz podjetja Educell, ki so mi pomagali pri mojih prvih korakih v laboratoriju.

Doc. Dr. Irmi Virant-Klun se zahvaljujem za dragocene nasvete pri sestavi gojišč in za pomoč pri interpretaciji rezultatov.

Za sodelovanje se zahvaljujem zdravnikom in osebju iz Kliničnega centra Ljubljana, Kliničnega oddelka za hematologijo, ki so skrbno izvedli odvzeme kostnega mozga ter vsem prostovoljnimi darovalcem, ki so velikodušno in nesebično pristali na sodelovanje v raziskavi.

Iskerno se zahvaljujem vsem, ki ste mi kakor koli pomagali pri nastajanju tega dela.

Najlepša hvala tudi mojim staršem, ki so mi omogočili čas in mir, da sem delo lahko pripeljala do konca.

PRILOGA

OBVEŠČENI PRISTANEK – IZJAVA PREISKOVANCA

Univerzitetni klinični center Ljubljana
Klinični oddelek za hematologijo
Zaloška c. 7
SI-1000 Ljubljana

Zavod RS za transfuzijsko medicino
Šlajmerjeva 6
SI-1000 Ljubljana

IZJAVA O POUČENOSTI IN PISNA PRIVOLITEV V POSTOPEK

Podpisani preiskovanec/-ka:

soglašam, da se lahko odvzeti vzorec mojega kostnega mozga, ki je sicer namenjen za analizo v diagnostične namene, uporabi tudi za dodatne raziskave matične celice, ki jih v okviru nacionalnih raziskovalnih projektov izvaja raziskovalna skupina »0311-002 Transfuzijska medicina«.

Eden izmed naslednjih strokovnjakov (Škerget Matevž, dr.med., Matjaž Sever, dr.med, mag. Samo Zver, dr.med, asis. mag. Irena Preložnik-Zupan, dr.med.) me je seznanil/-a s postopki odvzema vzorca, hkrati pa tudi odgovarja za mojo varnost pri tem dejanju.

Obveščen sem, da bodo moji osebni podatki anonimni, tako da bo zaščitena moja pravica do zasebnosti in omogočenopolno varovanje mojih osebnih podatkov.

Moje sodelovanje v raziskavi je popolnoma prostovoljno in vem, da ga lahko odklonim ali kadarkoli odstopim iz raziskave. Obvestili so me, da bodo rezultati raziskave služili napredku medicinskega znanja na področju celične terapije in regenerativne medicine. Obveščen/-a sem tudi, da je raziskavo odobrila Republiška komisija za medicinsko-etična vprašanja.

S podpisom te izjave prostovoljno pristajam na sodelovanje v zgoraj omenjeni raziskavi.

Datum:

Podpis preiskovanca/-ke: