

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Gašper KLANČAR

**PRIMERJAVA METOD IZOLACIJE MEZENHIMSKIH MATIČNIH
CELIC IZ HUMANEGA KOSTNEGA MOZGA Z IMUNOMAGNETNO
SELEKCIJO IN ADHERENCO NA PLASTIKO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF ISOLATION METHODS OF MESENCHYMAL
STEM CELLS FROM HUMAN BONE MARROW USING
IMUNOMAGNETIC SELECTION OR PLASTIC ADHERENCE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

POPRAVKI



*Strah namreč ni nič drugega,
kakor da človek izgubi oporo,
ki bi mu jo dala misel.*

*Čim bolj pa popušča notranja
zmožnost presojanja,
tem usodnejše je nepoznavanje
vzroka, ki prinaša trpljenje.*

MDR 17,11-12

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v Laboratoriju za pretočno citometrijo in Laboratoriju za celično biologijo Centra za imunohematologijo na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani v okviru raziskovalnega programa P3-0371 Človeške matične celice – napredno zdravljenje s celicami, v sodelovanju s Kliničnim oddelkom za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 8. 6. 2011 za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miomirja Kneževića in za somentorja izr. prof. dr. Primoža Rožmana.

Recenzentka: doc. dr. Tanja Kunej

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: doc. dr. Miomir KNEŽEVIĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Biobanka d.o.o., Trzin

Član: izr. prof. dr. Primož ROŽMAN
Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

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

Datum zagovora: 26. 8. 2011

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

Gašper KLANČAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 60:61(043.2)=163.6
KG	medicina/biotehnologija/mezenhimske matične celice/kostni mozeg/izolacija/ CD271/imunomagnetna selekcija/ločevanje/adherenca na plastiko/pretočna citometrija/imunobarvanje
AV	KLANČAR, Gašper
SA	KNEŽEVIĆ, Miomir (mentor)/ROŽMAN, Primož (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2011
IN	PRIMERJAVA METOD IZOLACIJE MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IZ HUMANEGA KOSTNEGA MOZGA Z IMUNOMAGNETNO SELEKCIJO IN ADHERENCO NA PLASTIKO
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XVII, 83 str., 17 pregl., 29 sl., 1 pril., 187 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Za delo z mezenhimskimi matičnimi celicami (MMC) je pomembno, da imamo dobro definirane in ponovljive metode osamitve, gojenja oz. proliferacije in diferenciacije celic. Optimalen izbor teh metod je ključen za zagotavljanje potrebne čistosti posameznih celičnih populacij. V diplomskem delu smo primerjali dve metodi osamitve MMC iz humanega kostnega mozga. Celice smo osamili z imunomagnetno selekcijo (ločevanjem) ali z adherenco na plastiko ter jih gojili v dveh različnih gojiščih (MSCGM-Mesenchymal Stem Cell Growth Medium in NHEM Plus-NH Expansion Medium Plus z dodatkom citokinov, ki omogočajo visoko proliferacijo MMC). Naš cilj je bil poiskati optimalno kombinacijo med načinom osamitve in vrsto uporabljenega gojišča. Na več časovnih odsekih gojenja MMC smo določili fenotipski sestav za MMC značilnih pozitivnih celičnih označevalcev Stro-1, CD73, CD90, CD105, CD166 in negativnega CD45, s čemer smo preverjali njihovo uniformnost. Preverili smo tudi osteodiferencijsko sposobnost MMC gojenih v obeh gojiščih. S kombinacijo prisotnosti celičnih označevalcev in analize sposobnosti osteodiferenciacije MMC smo določili, do katere pasaže je smiselno gojiti MMC. Ugotovili smo, da je najprimernejše gojišče MSCGM ne glede ali smo MMC osamili z adherenco na plastiko ali imunomagnetnim ločevanjem. V tem gojišču so imele vse celice značilen fenotipski sestav MMC – so močno pozitivne za celične označevalce CD90, CD73 in CD166, majhen delež celic je bil pozitiven na Stro-1 in CD105 ter bile so negativne za CD45. MMC so ohranile svoj značilen fenotip in sposobnost osteodiferenciacije do pasaže 10. V gojišču NHEM Plus pa celice izgubijo značilen fenotip, delež CD73 in CD105 pozitivnih celic se po pasaži 7 zmanjšuje. Potrebni bi bili dodatni osteodiferencijski testi za določitev ali MMC v tem gojišču izgubijo sposobnost osteodiferenciacije. Zaključili smo, da je optimalna metoda pridobite MMC adherenca na plastiko v kombinaciji z uporabo gojišča MSCGM. S tem postopkom bi pridobili dovolj celic ustreznega fenotipa in diferenciacijskega potenciala, ki bi bile primerne za uporabo v regenerativni medicini.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 60:61(043.2)=163.6
CX medicine/biotechnology/mesenchymal stem cells/bone marrow/isolation/CD271/
imunomagnetic selection/adherence on plastic/flow cytometry/imunocytochemistry
AU KLANČAR, Gašper
AA KNEŽEVIĆ, Miomir (supervisor)/ROŽMAN, Primož (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in
Biotechnology
PY 2011
TI COMPARISON OF ISOLATION METHODS OF MESENCHYMAL STEM
CELLS FROM HUMAN BONE MARROW USING IMUNOMAGNETIC
SELECTION OR PLASTIC ADHERENCE
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XVII, 83 p., 17 tab., 29 fig., 1 ann., 187 ref.
LA sl
AL sl/en
AB It is very important to have successful, well defined and reproducible isolation and culture methods when mesenchymal stem cells (MSCs) are used. Optimal selection of these methods is a key to ensure the necessary purity of individual cell lines. In this research project we compared two different isolation techniques for isolation of MSCs from adult human bone marrow. First method exploited well known adherence of MSC to plastic culture dishes and the second was based on immunomagnetic selection. Isolated MSC populations were further cultured in two different growth media (MSCGM-Mesenchymal stem Cell Growth Medium and NHEM Plus-NH Expansion Medium Plus with addition of cytokines which promote cell proliferation). Our goal was to find the optimal combination of isolation technique and growth medium. At various time points during MSC expansion cells were characterized for the expression of typical positive surface markers Stro-1, CD73, CD90, CD105, CD166 and negative CD45. With the expression of these surface markers we were able to monitor the uniformity of cultured stem cells. The osteodifferentiation potential of cultured MSCs was tested as well. The expression of previously mentioned surface markers and the osteodifferentiation potential was used to determine up to which passage MSC retain their stemness. The best growth medium was MSCGM both for the cell population isolated with adherence and also for cells isolated with immunomagnetic selection. In MSCGM all cells were positive for markers typical for mesenchymal phenotype – they strongly expressed CD90, CD73 and CD166, a small percent was also positive for Stro-1 and CD105 and they were negative for haematopoietic marker CD45. In MSCGM medium cells retained their mesenchymal phenotype and osteodifferentiation potential up to passage 10. On the other hand cells cultured in NHEM Plus medium lost their mesenchymal character because the percentage of CD73 and CD166 rapidly declined after passage 7. Some additional osteodifferentiation tests should be done to determine if the cells also loose the differentiation potential. We concluded that the optimal isolation method is isolation with adherence to plastic culture flasks in combination with cell expansion in MSCGM growth medium. This procedure gives us enough cells with desired phenotype and differentiation potential for successful use in regenerative medicine.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI).....	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik.....	IX
Kazalo prilog.....	XI
Okrajšave in simboli	XII
Slovarček.....	XIV
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 HIPOTEZA.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MATIČNE CELICE	3
2.2 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE.....	4
2.3 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE IN KOSTNI MOZEG.....	9
2.4 OSAMITEV MEZENHIMSKEH MATIČNIH CELIC IZ KOSTNEGA MOZGA	10
2.5 UPORABA MEZENHIMSKEH MATIČNIH CELIC V MEDICINI	13
2.6 IMUNOMAGNETNO LOČEVANJE.....	16
2.7 PRETOČNA CITOMETRIJA.....	18
3 MATERIAL IN METODE	21
3.1 LABORATORIJSKA OPREMA, MATERIAL, KEMIKALIJE IN GOJIŠČA.....	21
3.1.1 Laboratorijska oprema	21
3.1.2 Material	21
3.1.3 Kemikalije	22
3.1.4 Gojišča in raztopine.....	24
3.2 METODE	25
3.2.1 Pridobivanje vzorcev kostnega mozga.....	25
3.2.2 Osamitev enojedrnih celic.....	26
3.2.3 Določanje števila celic.....	27
3.2.4 Primerjava metod osamitve.....	28
3.2.4.1 Imunomagnetno ločevanje.....	28
3.2.4.1.1 Imunomagnetno označevanje celic.....	29
3.2.4.1.2 Magnetna separacija celic.....	29
3.2.4.1.3 Izračun izkoristka imunomagnetnega ločevanja	30
3.2.4.2 Klasična osamitev z adherenco na plastiko	30
3.2.5 Dohranjevanje celične kulture	31
3.2.6 Tripsinizacija	31
3.2.7 Shranjevanje celic.....	32
3.2.8 Primerjava rasti različnih populacij MMC	32
3.2.8.1 Gojenje populacij.....	33
3.2.8.2 Izris rastne krivulje	33

3.2.9	Osteodiferenciacija	34
3.2.9.1	Gojenje celic različnih kombinacij	34
3.2.9.2	Barvanje von Kossa	35
3.2.10	Analiza s pretočno citometrijo	35
3.2.10.1	Preverjanje učinkovitosti in čistosti populacije celic po imunomagnetnem ločevanju.....	36
3.2.10.2	Določanje istovetnosti MMC	37
3.2.11	Imunobarvanje	38
3.2.12	Statistika.....	40
4	REZULTATI.....	41
4.1	OSAMITEV ENOJEDRNIH CELIC	41
4.2	PRIMERJAVA METOD OSAMITVE	41
4.3	PRIMERJAVA RASTI RAZLIČNIH POPULACIJ MMC	43
4.4	OSTEODIFERENCIACIJA	44
4.5	ANALIZA S PRETOČNO CITOMETRIJO	47
4.5.1	Preverjanje učinkovitosti in čistosti populacije celic po imunomagnetnem ločevanju.....	47
4.5.2	Določanje istovetnosti MMC s celičnimi označevalci.....	49
4.6	IMUNOBARVANJE	56
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	59
5.1	RAZPRAVA	59
5.2	SKLEPI	64
6	POVZETEK	65
7	VIRI	67
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Kriteriji s katerimi definiramo humane MMC	7
Preglednica 2: Podrobnejši fenotipski profil MMC	8
Preglednica 3: Vloga izbranih celičnih označevalcev značilnih za MMC	9
Preglednica 4: Celičnih označevalci, ki so primerni za uporabo za osamitev MMC iz primarnega tkiva	12
Preglednica 5: Nekateri primeri humane terapevtske uporabe MMC	14
Preglednica 6: Nekateri najpogosteje uporabljeni fluorokromi za označevanje in podatki o valovnih dolžinah vzbujene in oddane svetlobe	20
Preglednica 7: Uporabljeni parametri za določanje števila celic na napravi Vi-Cell XR	27
Preglednica 8: Uporabljeni volumni kemikalij glede na velikost gojilne posodice	32
Preglednica 9: Volumen zamrzovalnega medija v odvisnosti od števila celic	32
Preglednica 10: Shema gojenja populacije ADH in MAG v gojilni posodici s 6 luknjicami	33
Preglednica 11: Shematski prikaz razporeditve vseh štirih kombinacij za osteodiferenciacijo	35
Preglednica 12: Sestava 70 µl mešanic za določanje učinkovitosti in čistosti populacije celic po imunomagnetskem ločevanju	36
Preglednica 13: Sestava 70 µL mešanic za različne kombinacije celičnih označevalcev	38
Preglednica 14: Označena in neoznačena protitelesa in njihove ustreznne negativne kontrole	40
Preglednica 15: Primerjava izplena celic, ki smo jih osamili, med imunomagnetskim ločevanjem (MAG) in klasično osamitvijo z adherenco na plastiko (ADH) iz istega začetnega števila celic MNC	42
Preglednica 16: Primerjava uspešnosti osteodiferenciacije med pasažami	47

Preglednica 17: Izkoristek imunomagnetnega ločevanja in deleži CD271 pozitivnih celic oziroma čistost frakcij med imunomagnetnim ločevanjem iz enakega začetnega števila celic MNC s pretočno citometrijo na celični označevalec CD271	48
--	----

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: V različnih razvojnih stopnjah v razvoju osebka se nahajajo MC z različnim razvojnim potencialom	4
Slika 2: Sposobnost diferenciacije mezenhimskih matičnih celic.....	5
Slika 3: Povečan prikaz jeklenega matriksa kolone s prikazanimi magnetnimi silami.....	16
Slika 4: Tristopenjsko ločevanje posredno imunomagnetno označenih celic	17
Slika 5: Shematični prikaz detektorskega sistema tipičnega pretočnega citometra (PMT-fotopomnoževalka fluorescenčnih detektorjev različnih valovnih dolžin (FL1-4))	19
Slika 6: Pretočni citometer FACSCalibur TM Becton Dickinson.....	20
Slika 7: Shema poteka dela.....	25
Slika 8: Osamitev enojedrnih celic s ločevalnim medijem Lympholyte®-H.....	26
Slika 9: Posredno imunomagnetno označena celica za celični označevalec CD271	29
Slika 10: MS kolona v magnetnem nosilcu MiniMACS pritrjen na MultiStand stojalu za magnetni nosilec (Miltenyi Biotec, 2008a).....	30
Slika 11: CD271 pozitivne celice, ki smo jih osamili s kompletom reagentov CD271 MicroBead	41
Slika 12: Število celic po osamitvi z imunomagnetnim ločevanjem v odvisnosti od dneva osamitve po odprtju kompleta reagentov	41
Slika 13: Morfologija MMC in njihova rast v enoslojni kulturi.....	43
Slika 14: Primerjava rasti populacij celic, ki smo jih osamili z imunomagnetnim ločevanjem (MAG) in z adherenco na plastiko (ADH) v kombinaciji z gojiščem MSCGM in NHEM Plus	44
Slika 15: Slike uspešnosti osteodiferenciacije s pripadajočimi kontrolami za kombinacijo populacije ADH v gojišču MSCGM za vzorec KM72 po izvedbi barvanja von Kossa.,	
45	
Slika 16: Slike uspešnosti osteodiferenciacije s pripadajočimi kontrolami za kombinacijo populacije MAG v gojišču MSCGM za vzorec KM72 po izvedbi barvanja von Kossa.....	45

Slika 17: Slike uspešnosti osteodiferenciacije s pripadajočimi kontrolami za kombinacijo populacije ADH v gojišču NHEM Plus za vzorec KM72 po izvedbi barvanja von Kossa.....	46
Slika 18: Slike uspešnosti osteodiferenciacije s pripadajočimi kontrolami za kombinacijo populacije MAG v gojišču NHEM Plus za vzorec KM72 po izvedbi barvanja von Kossa.....	46
Slika 19: Primer točkovnih diagramov karakterizacije MMC s pretočno citometrijo za KM67	48
Slika 20: Primer točkovnega diagrama karakterizacije MMC s pretočno citometrijo za vzorec KM 64	49
Slika 21: Primeri histogramov za karakterizacijo MMC s pretočno citometrijo za vzorec KM 66	50
Slika 22: Vpliv gojenja na izražanje celičnega označevalca Stro-1	51
Slika 23: Vpliv gojenja na izražanje celičnega označevalca CD73.....	52
Slika 24: Vpliv gojenja na izražanje celičnega označevalca CD105.....	53
Slika 25: Vpliv gojenja na izražanje celičnega označevalca CD166.....	54
Slika 26: Vpliv gojenja na izražanje celičnega označevalca CD45.....	55
Slika 27: Vpliv gojenja na izražanje celičnega označevalca CD271.....	56
Slika 28: Populacija ADH gojena v gojišču MSCGM v pasaži 3 pobarvana za celične označevalce in njihove kontrole (Preglednica 14) za KM61	57
Slika 29: Populacija MAG gojena v gojišču NHEM Plus v pasaži 3 pobarvana za celične označevalce in njihove kontrole (Preglednica 14) za KM62	58

KAZALO PRILOG

Priloga A: Izjava o poučenosti in pisna privolitev v postopek

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

7-AAD	amino aktinomicin (angl. <i>7-amino-actinomycin D</i>)
ACM	lat. <i>Arteria cerebri media</i>
AMP	adenozin-5'-monofosfat (angl. <i>adenosine-5'-monophosphate</i>)
AO	akridinoranžno (angl. <i>Acridine Orange</i>)
APC	alofikocianin (angl. <i>Alophycocyanin</i>)
BDNF	nevrotrofičen dejavnik (angl. <i>Bone-Derived Neurotrophic Factor</i>)
BSA	goveji serumski albumin (angl. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CD	označevalec pripadnosti (angl. <i>Cluster of Differentiation</i>)
CFU	kolonijska enota (angl. <i>Colony Forming Unit</i>)
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol (angl. <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DMEM/F12	Dulbeccovo modificirano gojišče: hranilna mešanica F12 (angl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium: nutrient mixture F12</i>)
DMSO	dimetil sulfoksid (angl. <i>Dimethyl sulfoxide</i>)
DPBS	fosfatni pufer brez Ca^{2+} in Mg^{2+} (angl. <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>)
EtBr	etidijev bromid (angl. <i>Ethidium Bromide</i>)
EDTA	etylendiaminotetraocetna kislina (angl. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGF	epidermalni rastni dejavnik (angl. <i>Epidermal Growth Factor</i>)
FACS	ločevalnik fluorescenčno označenih celic (angl. <i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i>)
FBS	fetalni goveji serum (angl. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
Fc	podenota imunoglobulina, ki vsebuje konstantne domene obeh težkih verig
FcR	Fc receptor; receptor za Fc del imunoglobulinov
FITC	fluorescin izotiocianat (angl. <i>Fluorescin isothiocyanate</i>)
FL	fluorescenčni detektor (angl. <i>Fluorescent detector</i>)
FSC	prednje sipanje svetlobe (angl. <i>Forward Scatter Channel</i>)
HLA	humalni levkocitni antigeni (angl. <i>Human Leukocyte Antigen</i>)
ICC	imunobarvanje (angl. <i>Immunocytochemistry</i>)
K ₃ EDTA	kalijev-3-EDTA
KM	kostni mozeg (angl. <i>Bone Marrow</i>)
KMC	krvotvorna matična celica (angl. <i>Hematopoietic Stem Cell</i>)
LNGFR	receptor za nevralni rastni dejavnik nizke afinitete (angl. <i>Low affinity Nerve Growth Factor Receptor</i>)
MAPC	multipotentna celica prednica odraslega (angl. <i>Multipotent Adult Progenitor Cell</i>)
MC	matična celica (angl. <i>Stem Cell</i>)
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (angl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MMC	mezenhimska matična celica (angl. <i>Mesenchymal Stem Cell</i>)
MNC	enojedrna celica (angl. <i>Mononuclear cell</i>)
MSCGM	gojišče namenjeno gojenju mezenhimskih matičnih celic podjetja Lonza (angl. <i>Mesenchymal Stem Cell Growth Medium</i>)

NHEM	gojišče namenjeno gojenju mezenhimskih matičnih celic podjetja Miltenyi Biotec (angl. <i>NH Expansion Medium</i>)
NHEM Plus	gojišču namenjeno gojenju mezenhimskih matičnih celic z dodatkom mešanice citokinov podjetja Miltenyi Biotec
NK	celica naravna ubijalka (angl. <i>Natural Killer</i>)
NTR	nevtropinski receptor (angl. <i>Neurotropin Receptor</i>)
PE	R-fikoeritrin (angl. <i>Phycoerythrin</i>)
PerCP	peridinin klorofil proteinski kompleks (angl. <i>Peridinin Chlorophyll Protein</i>)
PI	propidijev jodid (angl. <i>Propidium Iodide</i>)
PMT	fotopomnoževalka (angl. <i>Photomultiplier tube</i>)
Populacija ADH	populacija MMC osamljena z adherenco na plastiko
Populacija MAG	populacija MMC osamljena z imunomagnetnim ločevanjem
SSC	stransko sisanje svetlobe (angl. <i>Side Scatter Channel</i>)
SSEA	angl. <i>Stage-specific embryonic surface antigen</i>
TGFβ	transformirajoči rastni dejavnik beta (angl. <i>Transforming Growth Factor beta</i>)
UV	ultravijolična svetloba (angl. <i>Ultra Violet</i>)
VSEL	zelo majhne celice podobne embrionalnim amtičnim celicam (angl. <i>Very Small Embryonic-like Stem Cells</i>)

SLOVARČEK

Pojem	Razlaga
Adherentne celice	Celice, ki se pri gojenju pritrdijo na podlago oz. dno gojilne posode.
Adipocit	Je maščobna celica, specializirana za hranjenje energije v obliki maščobe. Maščobne celice nastanejo verjetno z diferenciacijo iz mezenhimske matične celice in tvorijo maščobno tkivo.
Alogenski	Tkivo, celice ali organ drugega osebka iste biološke vrste, ki pa je genetsko različen in zato tudi imunsko neskladen.
Asimetrična celična delitev	Asimetrična celična delitev je delitev, pri kateri nastaneta dve različno diferencirani hčerinski celici, od katerih je ena enaka svoji prednici in ohranja njeno matičnost, to je sposobnost samoobnavljanja in vzdrževanja pluripotentnosti.
Avtologen	Tkivo, celice ali organ, ki jih presadimo istemu osebku, ki jih je daroval.
Blastocista	Stopnja embrionalnega razvoja zarodka tik pred koncem brazdanja, pri človeku je to 4.-5. dan po oploditvi, sestavlja jo od 80 – 150 celic.
CD	Sistem za enotno označitev antigenov celične površine (predvsem levkocitov) z monoklonskimi protitelesi.
Celica prednica	S celico prednico opišemo vsako delečo se celico, ki se lahko razdeli in diferencira v vsaj dve različni hčerinski celici.
Celična kultura	Celična kultura predstavlja umetno gojišče, v katerem gojimo prokariontske in evkariontske celice <i>in vitro</i> v raziskovalne, diagnostične, terapevtske ali proizvodno-biotehnološke namene.
Celično zdravljenje	Pri celičnem zdravljenju gre za zdravljenje s presaditvijo različnih celičnih tipov.
CFU (Kolonijska enota)	Kolonijska enota predstavlja celo kolonijo bakterij ali drugih celic, ki izhajajo iz ene same celice prednice.
Citokin	Termin citokin se nanaša na heterogeno skupino topnih proteinov in peptidov, ki v nanomolarnih in pikomolarnih koncentracijah delujejo kot humoralni regulatorji in v normalnih ali patoloških razmerah urejajo delovanje tkiv in celic teko da omogočajo medcelično komunikacijo, spodbudijo imunski odziv in razmnoževanje celic
DAPI	DAPI ali 4,6-diamidino-2-fenilindol je fluorescentno barvilo, ki se močno veže na DNA. Uporabljajo ga pri fluorescenčni mikroskopiji za označevanje jedra celice. Ker prehaja skozi nepoškodovano celično membrano, lahko z njim barvamo žive ali fiksirane celice.
Dediferenciacija	Dediferenciacija je proces, v katerem se diferencirane somatske celice vrnejo v manj diferencirano multipotentno stanje.
Diferenciacija	Diferenciacija je proces, v katerem se manj specializirana celica razvije v bolj specializirano.
Ektoderm	Ektoderm je zunanja od treh embrionalnih plasti (kličnih listov), ki se razvije v povrhnjico kože (epidermis), v nohte, lase, epitelij nosu, ust in analnega kanala, očesno lečo, mrežnico, mlečno žlezo in živčni sistem.

Embrionalna matična celica (EMC)	Pluripotentne matične celice, ki jih najdemo v zgodnjem zarodku – blastocisti in jih lahko osamimo iz notranje celične mase, preden ta začne v procesu gastrulacije tvoriti klične liste.
Enojedrne celice (MNC)	Skupno ime za več vrst celic krvotvornega sistema, ki jih imenujejo tudi mononuklearni levkociti in se ločijo od ostalih levkocitov (granulocitov) po tem, da ne vsebujejo granul (agranulociti) in da imajo okroglo, nesegmentirano jedro. Vključujejo limfocite, plazmatke, monocite in makrofage ter različne vrste matičnih celic
<i>Ex vivo</i>	<i>Ex vivo</i> pomeni zunaj živega organizma, velikokrat ta pojem enačimo z <i>in vitro</i> . V znanosti se nanaša na poskuse ali meritve, ki jih izvajamo na osamljenih organih, tkivih in celicah v umetnem okolju, ki ponazarja naravnega.
Fetalni goveji serum	Običajen dodatek h gojiščem za gojenje celic, ki se pridobiva iz seruma nerojenih telet. Vsebuje razne rastne dejavnike.
Hondrocyt	Hrustančna celica. Hondrocyti so edine celice v hrustancu. Proizvajajo in vzdržujejo hrustančni matriks, ki je sestavljen iz kolagena in proteoglikanov. Nastanejo z diferenciacijo mezenhimskih matičnih celic.
<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> je besedna zveza, ki se v naravoslovju nanaša na procese v epruveti oziroma v umetnem okolju (laboratoriju).
<i>In vivo</i>	<i>In vivo</i> pomeni v živem osebku oz. v naravnem okolju.
Kostni mozek	Kostni mozek je mehko tkivo, ki se nahaja v dolgih kosteh. V kostnem mozgu poteka hematopoeza. Kostni mozek vsebuje med različnimi odraslimi celicami tudi več vrst matičnih celic, npr. mezenhimske, krvotvorne in druge matične celice.
Krvotvorna matična celica (KMC)	Je multipotentna matična celica v kostnem mozgu, iz katere nastanejo eritrociti, levkociti in trombociti.
Matična celica	Matična celica (MC) je nediferencirana celica v živih bitjih, ki ima dve ključni lastnosti: lastnost samoobnavljanja in lastnost potentnosti.
Mezenhim	Mezenhim ali mezenhimsko vezivno tkivo je vrsta embrionalnega mehkega vezivnega tkiva, ki nastane večinoma iz mezoderma, vendar tudi iz dveh ostalih kličnih listov zarodka.
Mezenhimska matična celica	Mezenhimske matične celice uvrščamo med stromalne celice kostnega mozga in imajo dvojno vlogo: a) predstavljajo izvor celic nekrvotvornih tkiv in b) so hkrati hranilne in podporne celice za rast in diferenciacijo krvnih celic in ostalih tkiv, saj sintetizirajo različne komponente zunajceličnega matriksa in različne rastne dejavnike. So multipotentne, diferencirajo se lahko v celice kosti, hrustanca, mišic in kože, verjetno pa tudi v celice drugih kličnih listov (ekto- in endoderma), kar še ni povsem raziskano.
Mezoderm	Klični list mezoderm je srednja od treh embrionalnih plasti, ki se razvije med gastrulacijo in leži med endodermom in ektodermom.
Morfologija	Preučevanje morfologije oz. izgleda in strukture celic v celični kulturi je osnoven način prepoznavanja različnih vrst celic.

Multipotentna celica prednica odraslega (MAPC)	Vrsta pluripotentnih celic iz kostnega mozga, ki imajo določene lastnosti embrionalnih matičnih, ki jih lahko diferenciramo v hondrocite, adipocite in kostne celice.
Multipotentna matična celica	Multipotentna matična celica je celica z manjšo potentnostjo in sposobnostjo diferenciacije v primerjavi s pluripotentno in totipotentno matično celico.
Nesmrtnost, celična	Biološka nesmrtnost bitja ali celice omogoča, da se to oz. ta v nekem obdobju svojega življenja neha starati. Nesmrtnih celic ne omejuje Hayflickova omejitev, ki pravi, da se celice po nekem času niso več sposobne deliti zaradi poškodb DNA in skrajšanih telomer.
Oligopotentna matična celica	Celica, sposobna tvoriti dve ali več različnih celičnih linij znotraj tkiva.
Pasaža	Presaditev celic v celični kulturi imenujemo pasaža; presaditev opravimo, ko celice v kulturi popolnoma prerastejo dno gojitvene posode (t.i. konfluentno stanje).
Plastičnost	Plastičnost je sposobnost tkivnih matičnih celic (MC odraslega), da se spremenijo v celico drugega kličnega lista ali da se spremenijo v odrasle celice drugega tkiva, kamor jih pred tem prenesemo.
Pluripotentna matična celica	Pluripotentna matična celica je celica, sposobna tvoriti vse telesne celice, vključno z germinalnimi celicami.
Poglavitni histokompatibilnostni kompleks	MHC je območje v genomu sesalcev, ki kodira površinske antogene na celičah, ki sodelujejo pri imunskega odziva. MHC je pomemben pri ločevanju lastnih molekul od tujih. Pri človeku se imenuje HLA.
Potentnost	Potentnost je sposobnost matičnih celic za diferenciacijo v različne, bolj usmerjene celične vrste.
Površinski označevalci	Površinski označevalci so proteini na površini celice, ki so značilni za določen tip celic. Zaznamo jih z uporabo barvil, z barvili označenih protiteles ali z drugimi metodami odkrivanja.
Predniška celica	Hčerinska celica, usmerjena potomka matične celice v direktni liniji. Je že delno diferencirana celica, lahko (je) tudi celica prednica različnim, bolj diferenciranim celičnim tipom celic. Iz nje nastanejo nove celice po seriji celičnih delitev.
Pretočni citometer	Pretočni citometer je naprava za analizo fluorescenčno označenih celic. Naprava lahko hitro ločuje celice v suspenziji glede na njihovo velikost ali barvo, s katero so označene. Uporabljamo jo za štetje določenih vrst celic ali za njihovo razvrščanje.
Proliferacija	Proliferacija je podvajanje celic, njihova rast in razvoj.
Regenerativna medicina	Regenerativna medicina je veja medicine, ki se ukvarja z obnovo fizioloških funkcij organov in tkiv in pri tem lahko uporablja tudi gojene celice in vitro, metode tkivnega inženirstva, različne naravne rastne dejavnike in druge biotehnološke metode.
Samoobnavljanje	Samoobnavljanje je posebna sposobnost matične celice, da s celično delitvijo nastane vsaj ena hčerinska celica, ki je popolnoma enaka materinski in ima enako latentno sposobnost diferenciacije.

Telomeraza	Encim v evkariontskih celicah, ki podaljšuje konci kromosomov (telomere) ob celičnih delitvah. Tako preprečuje njihovo degeneracijo oz. staranje.
Tkivno inženirstvo	Pri tkivnem inženirstvu uporabljamo celice, biokemične dejavnike, sintetične nadomestke in inženirske metode za izboljšanje biološke funkcije poškodovanega tkiva oz. organa.
Totipotentna matična celica	Totipotentna celica je celica, sposobna tvoriti celoten organizem, vključno z ekstraembrionalnim tkivom (trofoblast).
Transdeterminacija	Transdeterminacija je proces, pri katerem se predniške matične celice ene usmeritve nenadoma spremenijo v celice druge predniške usmeritve, npr. iz mezodermalnih nastanejo ektodermalne prednice.
Transdiferenciacija	Transdiferenciacija je proces, pri katerem se tkivne matične celice iz enega tkiva odraslega spremenijo (oz. diferencirajo) v specializirane celice drugega tkiva. Transdiferenciacija je naraven pojav in je eden od mehanizmov plastičnosti matičnih celic.
Unipotentna celica	Unipotentna celica je sposobna le razvoja v eno celično linijo.
Zelo majhna celica podobna embrionalni matični celici (VSEL)	So zelo majhne celice, podobne embrionalnim matičnim celicam. Odkrili so jih v kostnem mozgu in drugih tkivih. Kažejo določene embrionalne lastnosti, in vitro so jih diferencirali v tkiva vseh treh embrionalnih plasti. Domnevajo, da izhajajo iz embrionalnega razvoja in stalno naseljujejo določene dele organizma.
Zunajcelični matriks	Zunajcelični matriks predstavlja mikrookolje med celicami, ki jim nudi oporo, orientacijo in omogoča medcelične interakcije in nastanek vezivnega tkiva. Po navadi ga sestavlja intersticijski matriks in bazalna membrana. Intersticijski matriks se nahaja med celicami, bazalna membrana pa predstavlja sloj, na katerega so pripete epitelne celice.

(Rožman in Jež, 2011)

1 UVOD

V današnjem času večino poškodb in bolezni zdravimo bodisi s kirurškimi posegi ali z uporabo zdravil. Biotehniološke in biomedicinske raziskave pa odkrivajo vedno večji pomen novejših načinov zdravljenja z uporabo matičnih celic, ki obetajo vzročni način zdravljenja.

Matične celice (MC) so maloštevilna populacija nespecializiranih celic, ki jih najdemo v tkivu zarodka, pa tudi v tkivih odraslih živali in človeka. So nediferencirane, po obliki podobne majhnim limfocitom in sposobne dolgotrajnega asimetričnega deljenja, pri čemer na eni strani v procesu samoobnavljanja tvorijo sebi identične kopije na drugi strani pa nove linije bolj diferenciranih celic. Pri tem najprej nastanejo celice prednice (prekurzorji), iz njih pa nato funkcionalne celice tkiv.

Na splošno je pri delu z MC *in vitro* pomembno, da imamo dobro definirane in ponovljive metode osamitve, proliferacije in diferenciacije celic. Optimalen izbor teh metod je ključen tako za raziskovalno delo kot tudi za potencialno klinično uporabo celic. Še vedno pa se pojavljajo vprašanja, kako definirati določeno vrsto MC. Zato je večina znanstvenikov mnenja, da je na začetku dela potrebno natančneje preučiti fenotip uporabljenih MC (Martin-Rendon in Watt, 2003). Vse to velja tudi za mezenhimske metične celice (MMC).

MMC so morfološko in fenotipsko zelo raznolika populacija matičnih celic v kostnem mozgu (KM). So zelo redke in predstavljajo eno na 10.000 - 100.000 drugih celic KM. Spadajo med stromalne celice kostnega mozga in so izvor celic za ne-hematopoetska tkiva ter hkrati hranielne celice za podporo rasti in diferenciacije krvnih celic in ostalih tkiv. Sintetizirajo različne komponente zunajceličnega matriksa in različne rastne dejavnike. Ker imajo sposobnost, da se v kulturi prilepijo na plastično podlago gojitvene posode, jih je razmeroma preprosto osamiti in namnožiti do zadostnega števila, potrebnega za klinično uporabo. Z ustreznimi rastnimi dejavniki in citokini lahko te celice vzdržujemo v nediferenciranem stanju, v katerem tudi po številnih pasažah ohranijo vse lastnosti (samoobnavljanje, sposobnost diferenciacije ...), ali pa jih usmerimo v hrustančne, kostne, maščobne, mišične celice in celice vezivnega tkiva. To omogoča, da jih uporabimo pri zdravljenju poškodb mezenhimskega tkiva; tj. pri zlomih kosti, osteoporosi, obrabi hrustanca ipd. Te celice so verjetno sposobne tudi preskočiti iz mezodermalne linije v ektodermalno; iz njih namreč lahko nastanejo tako kardiomiociti kot tudi živčne celice, npr. astrociti in nevroni.

Kaže, da bo v naslednjem desetletju regenerativna medicina z uporabo MC postala najhitreje rastoča panoga medicine, priključili pa se ji bosta tudi spremljajoča farmacevtska in biotehniološka dejavnost.

1.1 NAMEN DELA

Za raziskave ali terapevtsko uporabo je potrebno MMC najprej osamiti iz KM. Obstaja več metod osamitve. Zato je cilj naloge primerjati dve metodi osamitve, t.i. imunomagnetno selekcijo (ločevanje) in adherenco na plastiko ter ugotoviti, katera metoda osamitve MMC

iz humanega kostnega mozga je bolj učinkovita in časovno in cenovno bolj ugodna. Poleg tega je bil naš cilj preveriti vpliv dveh gojišč, t.i. NH Expansion Medium (NHEM) in Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM), na pomnoževanje MMC ter potrditi prisotnost značilnih celičnih označevalcev MMC in njihovo sposobnost osteodiferenciacije. Tako bomo določili optimalno kombinacijo metode izolacije in gojišča, pri kateri bomo pridobili največje število celic, ki izražajo značilen fenotipski profil MMC in ohranjajo diferenciacijski potencial.

1.2 HIPOTEZE

Naše delovne hipoteze so naslednje:

- a) Z imunomagnetnim ločevanjem dobimo večje število MMC z manjšo populacijsko heterogenostjo v primerjavi s klasično metodo osamitve z adherenco na plastiko.
- b) MMC se bolje pomnožujejo v gojišču NH Expansion Medium (NHEM) kot v gojišču Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM).
- c) MMC lahko namnožujemo od 8 do 15 pasaže brez značilnega vpliva na njihovo zmožnost pomnoževanja.
- d) Populaciji MMC, ki ju bomo osamili z imunomagnetnim ločevanjem in klasično metodo adherence na plastiko, se statistično značilno ne razlikujeta v rastnih krivuljah, celičnih označevalcih CD73, CD90, CD105, CD166, CD45 in Stro-1 ter v sposobnosti osteodiferenciacije.
- e) Z obema metodama osamitve bomo uspešno osamili populacijo MMC iz KM, ki je pozitivna na celične označevalce Stro-1, CD73, CD90, CD105 in CD166 ter negativna na označevalec CD45.
- f) Delež CD271 pozitivnih celic se v pasažah zmanjšuje in s tem kot celični označevalec ni dober za karakterizacijo MMC.

2 PREGLED OBJAV

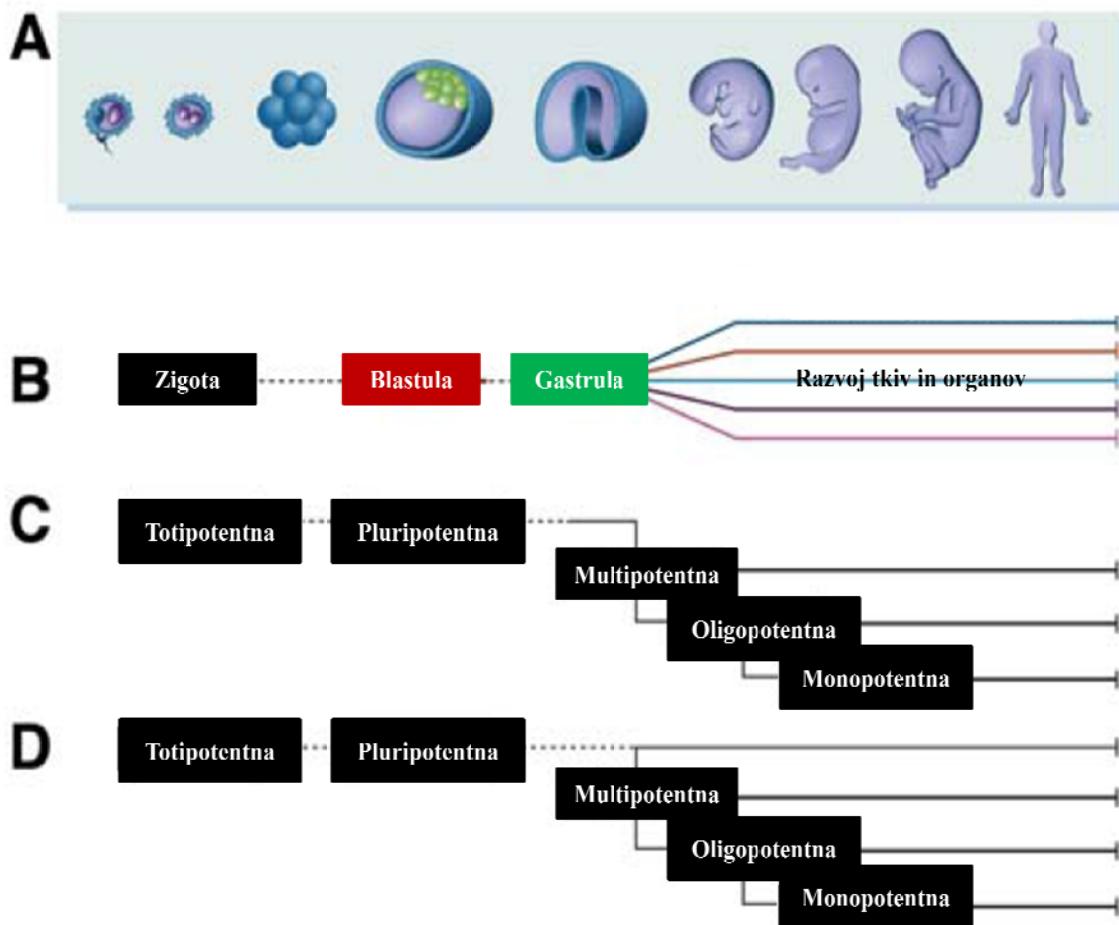
2.1 MATIČNE CELICE

MC so maloštevilna populacija nediferenciranih celic, ki so po obliki podobne limfocitom. Nahajajo se v vseh tkivih živih bitij, na vseh življenjskih stadijih od tkiv zarodka do tkiv odraslega človeka. Njihova posebnost izvira iz njihovih ključnih lastnosti neomejenega samoobnavljanja, diferenciacije v specializirane celice in plastičnosti (Rožman in Jež, 2011).

MC se samoobnavljajo z asimetrično celično delitvijo pri kateri nastaneta dve neenaki hčerinski celici. Taka delitev omogoča vzdrževanje populacije matičnih celic v stalnem številu. Pri delitvi tako nastane ena identična kopija MC in ena bolj diferencirana hčerinska celica. Te celice imajo manjši razvojni potencial od prvih in jih imenujemo prekurzorske celice, iz njih pa nastanejo funkcionalne celice tkiv. Na ta način število MC ostaja konstantno, nadaljnje delitve ene hčerinske celice pa omogočajo hitro razširitev populacije diferenciranih celic glede na potrebe (Rožman in Jež, 2011; Rožman in sod., 2007).

Pomembna lastnost MC je tudi plastičnost. Plastičnost pomeni, da so se MC sposobne diferencirati v celice drugih tkiv in ne samo v celice tkiva iz katerega izhajajo. Plastičnost lahko razložimo s štirimi različnimi elementi. Prvi je sposobnost dediferenciacije, pri kateri se odrasle ali linijsko usmerjene predniške celice vrnejo v bolj primitivno obliko. Druga sposobnost je transdiferenciacija, pri kateri se diferencirane celice enega tkiva odraslega spremenijo v diferencirane celice drugega tkiva s tem, da pridobijo njihove fenotipske značilnosti. Tretji element je sposobnost transdeterminacije, pri kateri se celice ene predniške linije spremenijo v celice druge predniške linije (npr. iz mezodermalnih nastanejo ektodermalne prednice). Zadnja sposobnost pa je fuzija, pri kateri se MC združi z drugo že diferencirano celico tkiva, pri čemer nastane čisto nova celična vrsta. Ta sposobnost izjemne plastičnosti ponuja edinstvene možnosti za zdravljenje različnih bolezni, za uporabo pri celičnem in genskem zdravljenju ter za različna druga področja regenerativne medicine (Rožman in Jež, 2011; Rožman in sod., 2007).

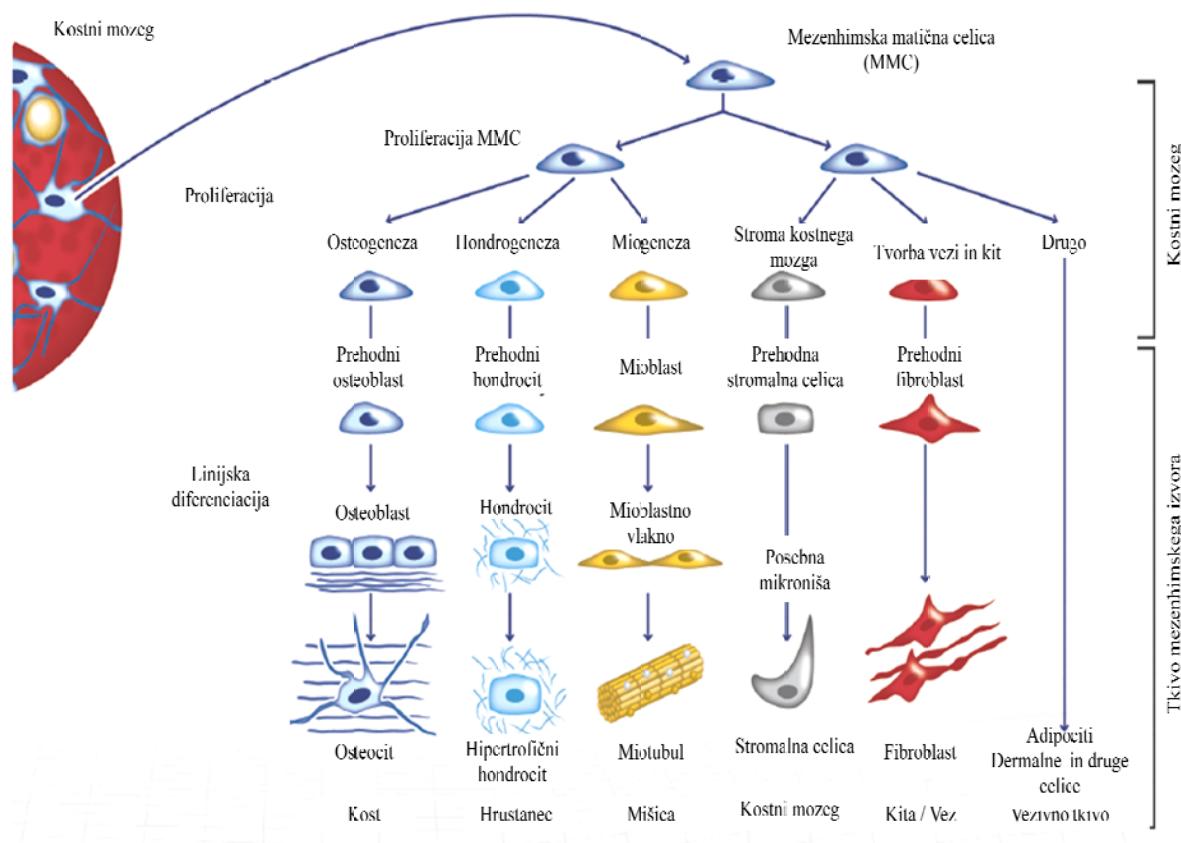
Po sposobnosti diferenciacije MC razdelimo na totipotentne, pluripotentne, multipotentne in unipotentne (**Slika 1**). Totipotentne celice so se sposobne diferencirati v vse celične vrste osebka in v celice trofoblasta. Primer so celice iz zgodnjega embrija (starost 1-3 dni, embrionalne matične celice). Trofoblast je del blastociste, ki se ugnezdi v steno maternice in se kasneje razvije v posteljico. Pluripotentne celice so se sposobne diferencirati v vse tri celične plasti (mezoderm, ektoderm in endoderm), niso pa se sposobne razviti v trofoblast. Primer teh celic so nekatere celice blastociste (starost 5-14 dni). Multipotentne celice, lahko jih imenujemo tudi oligopotentne, pa so se sposobne razviti oz. diferencirati v več celičnih vrst znotraj ene od treh celičnih plasti. Viri teh celic so zarodna tkiva, popkovnična kri, kostni mozeg, maščobno tkivo itd. Unipotentne MC pa se diferencirajo le v eno celično vrsto in jih zato imenujemo tudi predniške celice ali progenitorji. Primer so predniške epitelne celice (Choumerianou in sod. 2008; Rožman in sod., 2007).



Slika 1: V različnih razvojnih stopnjah v razvoju osebka se nahajajo MC z različnim razvojnim potencialom (prirejeno po Zipori, 2005). A, B: stopnje razvoja človeka, kjer najdemo matične celice z različnim razvojnim potencialom, C: korelacija ključnih razvojnih stopenj z razvojnim potencialom matičnih celic, D: nova odkritja dokazujejo prisotnost pluripotentnih matičnih celic v odraslem osebku.

2.2 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE

Mezenhimske matične celice (MMC, angl. *MSC*, *mesenchymal stem cells*, znane tudi kot *marrow stromal cells* (Prockop, 1997) ali *MPC*, *mesenchymal progenitor cells* (Conger in Minguell, 1999)) so bile definirane kot samoobnavljajoče matične celice, ki imajo sposobnost diferenciacije v več različnih tipov mezenhimskih tkiv oz. mezenhimskih celičnih linij (Caplan, 2009; Da Silva Meirelles in sod., 2008). Do sedaj so dokazali, da imajo MMC razvojni potencial za diferenciacijo v vezivno skeletno tkivo, stromalne celice kostnega mozga, titive, kost (osteoblaste), hrustanec (hondrocyte), adipocite (Alhadlaq in Mao, 2003; Pittenger in sod., 1999). Druge raziskave so pokazale, da se lahko MMC razvijejo tudi v skeletne in srčno mišične celice (Wakitani in sod., 1995; Makino in sod., 1999; Planat-Benard in sod., 2004), endoteljske celice (Oswald in sod., 2004) in celo v celice nemezodermalnega izvora, kot so hepatociti (Chagraoui in sod., 2003), nevralne celice (Woodbury in sod., 2000) in epitelne celice (Spees in sod., 2003; Ma in sod., 2006). Zato lahko za opis diferenciacijskih sposobnosti MMC uporabljam izraz multipotentne ali pluripotentne celice, saj so se sposobne diferencirati v široko paleto tkiv sesalcev (**Slika 2**)



Slika 2: Sposobnost diferenciacije mezenhimskih matičnih celic (Hematopoietic and mesenchymal stromal cell pathway, 2011).

(Jiang in sod., 2002). Njihova pluripotentna lastnost pa še ni čisto raziskana. Ker je pridobivanje homogene populacije izbranih celic težavno, običajno pri osamitvi pridobimo heterogeno populacijo celic. V tej populaciji prevladujejo MMC ob prisotnosti manjšega deleža drugih primitivnih populacij celic. Te druge primitivne populacije so verjetno tudi celice MAPC in VSEL.

Multipotentne celice prednice odraslega (MAPC, angl. *Multipotent Adult Progenitor Cells*) so pluripotentne adherentne matične celice, ki se nahajajo v KM in imajo določene lastnosti embrionalnih matičnih celic (imajo veliko telomerazno aktivnost in izražajo pluripotentne označevalce, *in vitro* se diferencirajo v celice značilne za vse tri zarodne plasti, ob vnosu v blastocisto prispevajo k razvoju večine celic, ipd.) Celice MAPC šibko izražajo celične označevalce CD90, CD133, β2-mikroglobulin, VEGFR2 (Flk-1), močneje pa izražajo CD13 in CD49b (Rožman in Jež, 2011; Sohni in Verfaillie, 2011; Schwartz in sod., 2002). Nekateri celo navajajo, da so prednice MMC (Reyes in sod., 2002). Ni pa jasno, ali MAPC v nizkem številu obstajajo v organih in tkivih odraslega, ali pa nekatere MMC v kulturi po procesu dediferenciacije pridobijo lastnosti, podobne embrionalnim matičnim celicam, ki jih nato opisujemo kot MAPC (Raff, 2003).

Zelo majhne celice podobne embrionalnim matičnim celicam (VSEL, angl. *Very Small Embryonic-like Stem Cells*) so majhne celice, ki imajo veliko jedro z neorganiziranim

kromatinom in ozek obod citoplazme. Imajo določene lastnosti embrionalnih matičnih celic (imajo veliko telomerazno aktivnost in izražajo pluripotentne označevalce, *in vitro* se diferencirajo v celice značilne za vse tri zarodne plasti). V KM predstavljajo 0,01% enojedrnih celic (MNC, angl. *Mononuclear cell*). Ne izražajo antigenov MHC-I in HLA-DR ter so negativne za površinske označevalce CD90, CD105 in CD29. Celice VSEL imajo vlogo pri ohranjanju homeostaze, ob poškodbi tkiva ali stresu pa se sprostijo v periferno kri in pomagajo pri obnovi poškodovanega tkiva oziroma organa. Mobilizacija teh celic ob nepravem času in njihovo zasidranje na neprava mesta pa naj bi povzročila nastanek tumorjev (Ratajczak in sod., 2007; Kucia in sod., 2007a, b; Kucia in sod., 2008; Weber, 2010).

MMC proučujemo v celičnih kulturah, kjer tvorijo kolonije. Opažamo kolonije različnih velikosti z različno dinamiko rasti in različno morfologijo; najdemo vretenaste, fibroblastom podobne celice, poleg njih pa tudi velike sploščene celice (Bianco in sod., 2001). Celice rastejo *in vitro* omejen čas, med 8 in 15 pasaž oziroma med 25 in 40 populacijskih podvojevanj (Wagner in Ho, 2007). Človeške MMC tudi po daljem gojenju *in vitro* ohranijo svojo diferenciacijsko sposobnost, zato so primerne tako za celično zdravljenje kot v vlogi vektorja za gensko manipulacijo *ex vivo*.

MMC so prvotno osamili iz KM in kasneje iz miščnega, maščobnega in vezivnega tkiva (Zuk in sod., 2001; Nakahara in sod., 1991; Nathanson, 1985). Pogostnost in sposobnost diferenciacije MMC, ki so jih osamili iz prej omenjenih tkiv, se zmanjšuje s starostjo osebka (D'Ippolito in sod., 1999), zato raziskovalci iščejo nove (alternativne) vire »mladih« potentnih MMC.

MMC so poleg KM osamili tudi iz humane amnijske tekočine, placente, popkovnične krvi in popkovnice (Whartonova žolica) (In't Anker in sod., 2004; Erices in sod., 2000; Panepucci in sod., 2004). Našli so jih tudi v nekaterih tkivih ploda kot so kostni mozeg, jetra, kri, pljuča in vranica (Campagnoli in sod., 2001; Gotherstrom in sod., 2003; In't Anker in sod., 2003). MMC, ki so jih osamili iz sinovialnih ovojnici kot adherentno celično populacijo, so bile sposobne diferencirati v hondrocite, osteocite in adipocite (De Bari in sod., 2001). Za te celice so tudi pokazali, da so prispevale k regeneraciji skeletnih mišic v golih miših in so tudi pripomogle k ponovni vzpostavitvi izražanja distrofina v sarkolemah in distrofičnih mišicah v imunosupresiranih miškah (De Bari in sod., 2003).

MC iz maščobnega tkiva imajo podobno sposobnost diferenciacije kot MMC iz KM (Dragoo in sod., 2003; Gimble, 2003). De Ugarte in sod. (2003) pa poročajo, da je zelo majhna razlika med celicami iz KM in maščobnega tkiva v smislu rasti, celične senescence in spodbobnosti diferenciacije v različne celične tipe. Tako je uporabnost teh celic odvisna le od razpoložljivosti vira celic in njihove sposobnosti podvojevanja. Kaviani in sod. (2001) so prvi opisali prisotnost subpopulacije celic z mezenhimskimi lastnostmi v amnijski tekočini. Te celice so sposobne hitrejšega podvojevanja kot fetalne in odrasle celice. In't Anker in sod. (2004) pa so pokazali da je lahko amnijska tekočina dober vir fetalnih celic, ki imajo enak fenotip in sposobnost diferenciacije kot MMC kostnega mozga. Značilnosti teh celic in odsotnost etičnih zadržkov ob njihovi osamitvi kažejo, da bi MC iz amnijske tekočine lahko bile dober vir celic za uporabo v tkivnem inženirstvu in celični terapiji številnih človeških bolezni. Multipotentne celice so našli tudi v skeletnih

mišicah in dokazali, da se diferencirajo v mezenhimska tkiva, funkcionalno regenerirajo kosti in mišice, igrajo pa tudi vlogo pri zdravljenju hrustanca (Pate, 1993; Young in sod., 1993; Rogers in sod., 1995; Williams in sod., 1999).

Velik terapevtski potencial MMC je povzročil veliko zanimanje zanje v različnih biomedicinskih vedah. V različnih objavah raziskovalci poročajo o različnih metodah osamitve in gojenja oz. namnoževanja ter različnih pristopih karakterizacije celic. Zato je Komite za mezenhimske in tkivne matične celice mednarodnega združenja za celično terapijo (Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committe of the ISCT, angl. *International Society for Cellular Therapy*) predlagal tri minimalne kriterije s pomočjo katerih lahko definiramo humane MMC (**Preglednica 1**). Prvi kriterij: MMC morajo biti sposobne adherence na plastiko v standardnih pogojih gojenja v gojilnih posodicah. Drugi kriterij: $> 95\%$ populacije MMC mora izražati celične označevalce CD73, CD90 in CD105 ter odsotnost ali $\leq 2\%$ populacije MMC lahko izraža celične označevalce specifične za hematopoetske ali endotelijalne celice CD45, CD34, CD14 ali CD11b, CD79α ali CD19 in HLA-DR. Tretji kriterij: populacija MMC mora imeti sposobnost *in vitro* diferenciacije v osteoblaste, adipocite in hondroblaste (Dominici in sod., 2006; Sensebe in sod., 2010).

Preglednica 1: Kriteriji s katerimi definiramo humane MMC.

Kriterij	Opis kriterija
1	<ul style="list-style-type: none">sposobnost adherence na plastiko v standardnih pogojih gojenja v gojilnih posodicah
2	<ul style="list-style-type: none">95% populacije mora izražati celične označevalce CD73, CD90 in CD105odsotnost ali $\leq 2\%$ populacije lahko izraža celične označevalce specifične za hematopoetske ali endotelijalne celice CD45, CD34, CD14 ali CD11b, CD79α ali CD19 in HLA-DR.
3	<ul style="list-style-type: none">sposobnost diferenciacije <i>in vitro</i> v osteoblaste, adipocite in hondroblaste

Če pogledamo fenotipski profil MMC podrobneje (**Preglednica 2**) ugotovimo, da so MMC pozitivne za celične označevalce Stro-1, CD10, CD13, CD29 (β -integrin), CD44 (HCAM), CD49e ($\alpha 5$ -integrin), CD54 (ICAM-1, intercellular adhesion molecule), CD58, CD71, CD73 (ecto-5' nucleotidaza, SH3, SH4), CD90 (Thy-1), CD105 (endoglin, SH2), CD106 (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule), CD140b (receptor β za trombocitni rastni dejavnik), CD146, CD166 (ALCAM, activated leukocyte cell adhesion molecule), CD133 (HER-2/erbB2), vimentin, šibko izražajo HLA razred I in CD123 in nekatere druge rastne dejavnike in citokine ter druge adhezijske molekule (Gang in sod., 2004; Rubio in sod., 2007; Wang in sod., 2005; Kogler in sod., 2006; Wexler in sod., 2003). Stopnja izražanja površinskih celičnih označevalcev MMC je pri zgodnjih pasažah višja kot pri poznih pasažah. Iz tega lahko sklepamo, da se verjetno v telesu nahaja heterogena populacija MMC. Odvisno od vira celic in pogojev gojenja pa lahko izražajo tudi CD349 (frizzled-9), SSEA-4, Oct-4 in nestin (Battula in sod., 2007). MMC pa so negativne za celične označevalce CD4, CD8, CD11a, CD14, CD15, CD16, CD25, CD31, CD33, CD34, CD45, CD49b, CD49d, CD49f, CD50, CD62e, CD621, CD62P, CD80, CD86, CD106, CD117, CD235 (glikoforin A), kadherin V in HLA-DR (Gang in sod., 2004; Rubio in sod., 2007; Wang in sod., 2005; Kogler in sod., 2006; Wexler in sod., 2003; Sabatini in sod., 2005; Reyes in Verfaillie, 2001; Verfaillie, 2005a, b). Posamezni celični označevalci imajo v celici točno določene funkcije (**Preglednica 3**).

Preglednica 2: Podrobnejši fenotipski profil MMC.

Celični označevalci	
Pozitivni	Negativni
Stro-1, CD10, CD13, CD58, CD71, CD73 (ecto-5' nucleotidaza, SH3, SH4), CD90 (Thy-1), CD105 (endoglin, SH2), CD140b (receptor β za trombocitni rastni dejavnik), CD146, CD133 (HER-2/erbB2), vimentin	CD4, CD8, CD11a, CD14, CD15, CD16, CD25, CD31, CD33, CD34, CD45, CD49b, CD49d, CD49f, CD50, CD62e, CD621, CD62P, CD80, CD86, CD106, CD117, CD235 (glikoforin A), kadherin V, HLA-DR
adhezijske molekule: CD29 (β-integrin), CD44 (HCAM, homing associated cell adhesion molecule), CD49e (α5-integrin), CD54 (ICAM-1, intercellular adhesion molecule), CD106 (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule), CD166 (ALCAM, activated leukocyte cell adhesion molecule),	
šibko izražanje: HLA razreda I, CD123	
odvisno od vira celic in pogojev gojenja: CD349 (frizzled-9), SSEA-4, Oct-4, nestin	
ter drugi rastni dejavniki, citokini ter druge adhezijske molekule	

Preglednica 3: Vloga izbranih celičnih označevalcev značilnih za MMC (Pernick, 2010a, b).

Celični označevalec	Celice, ki ga izražajo	Funkcija
CD73 (SH3, SH4)	celice T in B, dendritične celice, epitelne celice, endotelne celice	<ul style="list-style-type: none">encim, ki katalizira defosfobilacijo AMP v adenozin,posreduje signal za aktivacijo celic T in adherzijo limfocitov na dendritične celice in endotelne celice.
CD90 (Thy-1)	CD34+ protimiociti, nezrele KMC, nevroni, vezivna tkiva, aktivirane endotelne celice, fibroblasti, kardiocitne MC	<ul style="list-style-type: none">posreduje signal za diferenciacijo KMC in sinapsogenezo v centralnem živčnem sistemuposreduje pri adheziji različnih belih krvnih teles, da aktivirajo endotelne celice
CD105 (endoglin, SH2)	endotelne celice, podset celic kostnega mozga (B limfoidnega in mieloičnega izvora), aktiviranih monocitih, eritroidnih prekurzorjih v KM, celicah sinciciotrofoblasta in citotrofoblasta	<ul style="list-style-type: none">receptor za TGF-β kompleksaposreduje pri celičnem odgovoru TGF-βligand za integrinnujen za razvoj hemangioblastov in zgodnjih hematopoetičnih celic
CD166 (ALCAM)	celice T, celice NK, trombociti, aktivirane celice B in T, eozinofilci, fibroblasti, endotelne celice, keratinociti, živčne celice	<ul style="list-style-type: none">adhezijska molekulaligand za VLA-4udeležen pri embrionalni hematopoezi in angiogenezi ter podaljševanju nevronov

2.3 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE IN KOSTNI MOZEG

KM je kompleksno tkivo, ki vsebuje krvotvorne matične celice (KMC) in vezivno tkivo, ki ga sestavlja mreža stromalnih celic. Stroma je tkivo kostnega mozga, ki ni neposredno povezano z njegovo krvotvorno dejavnostjo. Stromo sestavljajo fibroblasti (vezivne celice), makrofagi, adipociti (maščobne celice), osteoblasti, osteoklasti in endotelijalne celice. V stromi se nahajajo tudi MMC. Kri in sistem, ki tvori KM, imenujemo krvotvorni sistem, ki je sestavljen iz številnih celičnih tipov s točno določeno funkcijo. KMC so prednice treh vrst krvnih celic (bele in rdeče krvne celice in krvne ploščice). Rdeče krvne celice (eritrociti) do tkiv prenašajo kisik. Krvne ploščice (trombociti), ki nastanejo iz megakariocitov, pomagajo pri preprečevanju krvavitev. Bele krvne celice (levkociti) med katere spadajo monociti, limfociti (celice B in T) in granulociti (neutrofilci, bazofilci in eozinofilci) ter makrofagi, branijo telo pred okužbami z bakterijami, glivami in drugimi paraziti. Nekatere od teh celic sodelujejo pri preoblikovanju tkiv in kosti ter odstranjujejo odmrle celice. Celice B proizvajajo protitelesa, medtem kot celice T neposredno ubijejo ali odstranijo tujke, ki so lahko z virusi okužene celice ali celo rakave celice. Veliko krvnih celic živi le kratek čas, zato jih mora telo stalno nadomeščati; povprečen človek potrebuje dnevno 100 milijard novo nastalih krvnih celic. Za to proizvodnjo so odgovorne KMC (Chen in sod., 2004).

Stromalne celice vključujejo podpopulacijo nediferenciranih celic, ki so se sposobne diferencirati v različne fenotipe: kost, hrustanec, titive, mišice, maščobo in stromalno vezivno tkivo, ki podpira diferenciacijo krvotvornih celic (Dexter in Testa, 1976; Friedrich in sod., 1996). Med stromalne celice spadajo vse nekrvotvorne celice: MMC, osteoblasti, fibroblasti, retikularne celice in maščobne celice (Kiel in Morrison, 2008). MMC imajo v KM dvojno vlogo, saj predstavljajo izvor celic za ne-hematopoetska tkiva in obenem hranilno plast za podporo rasti in diferenciacijo krvnih celic.

MMC predstavljajo v KM zelo majhno frakcijo celic, saj jih je med 0,001 in 0,01% izmed vseh MNC (Pittenger in sod., 1999). Obstaja že cela vrsta definiranih pogojev za osamitev, proliferacijo in *in vitro* ter *in vivo* diferenciacijo MMC. Zanje je značilno, da se njihov mezenhimski potencial diferenciacije ohranja med gojenjem *in vitro* (Brunder in sod., 1997; Sekiya in sod., 2002).

Čeprav KM predstavlja enega glavnih virov MMC (Pittenger in sod., 1999; Haynesworth in sod., 1992), njihova uporaba ni vedno sprejemljiva zaradi visoke stopnje izpostavljenosti virusom in občutnega zmanjšanja števila celic, proliferacijskega in diferenciacijskega potenciala s starostjo. Poleg tega je postopek odvzema KM boleč. Zato je nujno določiti še druge že opisane alternativne vire MMC, kar bi povečalo uporabo MMC v zdravljenju (Stenderup in sod., 2003; Nishuda in sod., 1999; Mueller in Glowacki, 2001; Zhang in sod., 2005).

2.4 OSAMITEV MEZEHNIMSKIH MATIČNIH CELIC IZ KOSTNEGA MOZGA

Za uporabo v tkivnem inženirstvu je nujno, da začnemo z dobro definirano začetno populacijo celic, da lahko nato standardiziramo protokole in dobimo zanesljive ter ponovljive rezultate. Obstaja veliko različnih postopkov osamitve definirane populacije celic iz različnih tkiv, osredotočili smo se na humani KM.

Čeprav je prisotnost MMC v kostnem mozgu prvi opisal patolog Cohnheim okoli leta 1870, pripisujejo to odkritje Alexandru Friedensteinu. Friedenstein in sod. je leta 1970 na podlagi adherence MMC na plastiko in sposobnosti tvorbe kolonij fibroblastne narave, razvil preprosto tehniko za njihovo osamitev. Vzorec polnega KM je gojil v plastični gojilni posodici in po 24 h odstranil neadherentne celice. S tem je odstranil večino KMC in njihove progenitorje. Ugotovil je, da je v posodici ostal majhen delež celic vretenaste oblike. Te celice so se začele močno podvajati po 2 – 4 dnevnom dormantnem stanju. Opazil je, da so se izoblikovale kolonije, ki spominjajo na kostne ali hrustančne depozite (Prockop, 1997). Znanstveniki še danes uporabljajo to značilnost MMC pri njihovi osamitvi. Na ta način je namreč Friedenstein ločil majhen delež MMC ($1 \text{ MMC na } 10^4 - 10^5 \text{ MNC}$) od ostalih krvnih celic. Pri tem načinu osamitve še vedno dobimo heterogeno populacijo celic, kjer so lahko prisotni še drugi celični tipi. Zato se pojavljajo dvomi o diferenciacijski sposobnosti posameznih MMC (Prockop, 1997; Lee in sod., 2004).

Za osamitev populacije MMC iz MNC z imunomagnetskim ločevanjem (glej poglavje: Imunomagnetno ločevanje) še ni znanega enega specifičnega celičnega označevalca, ki bi omogočal dobro osamitev. Zato je še vedno v široki uporabi osamitev MMC, ki izkorišča njihovo sposobnost adherence na plastično podlago (Wakitani in sod., 1995). Sama metoda

temelji na metodi Friedensteina z nekaj izboljšavami. Tako najprej MNC osamimo, resuspendiramo ter nasadimo v gojilno posodico z nasaditveno gostoto $0,5 - 2 \times 10^6$ MNC/cm². Neadherentne celice odstranimo po 24 – 72 h tako, da odstranimo gojišče in ga zamenjamo s svežim. Po 1 tednu dobimo heterogeno populacijo, ki je sestavljena iz stromalnih celic KM. S spremnjanjem gojišča in odstranjevanjem neadherentnih celic po 2 – 3 tednih pridobimo relativno homogeno populacijo celic z morfološkimi in fenotipskimi lastnostmi MMC (Nardi in Meirelles, 2006).

Obstajajo tudi metode osamitve na osnovi filtracije. Pri tej metodi filtriramo celice KM preko 3 µm sita (Hung in sod., 2002; Tuli in sod., 2003). Nekatere metode pa temeljijo na spremnjanju nasaditvene gostote celic (Colter in sod., 2000; Sekiya in sod., 2002).

Vendar noben od teh pristopov ne zagotovi osamitve homogene populacije celic. Zato so raziskovalci razvili tehniko, ki temelji na osamitev populacije MMC iz MNC z imunomagnetskim ločevanjem. Postopek ločevanja temelji na označevanju celic s specifičnimi protitelesi proti določenemu antigenu oz. celičnemu označevalcu. Do sedaj je bilo raziskanih in dokazano uporabnih le nekaj celičnih označevalcev, ki so primerni za uporabo za osamitev MMC iz primarnega tkiva. Predlaganih celičnih označevalcev pa je veliko več, vendar niso vsi v širši uporabi. Te celične označevalce, ki ustrezajo vsem kriterijem, lahko razdelimo v dve skupini (**Preglednica 4**). Prva skupina so celični označevalci za uporabo pri pozitivni selekciji, druga pa za uporabo pri negativni selekciji.

Prva skupina so celični označevalci za uporabo pri pozitivni selekciji. Tu označimo želene celice in jih osamimo iz suspenzije celic, ti so: antifibroblastni antigen, CD44 (PGP-1, ECMR-3), CD49a (integrin α1), CD49e (integrin α5), CD56 (NCAM), CD63 (MLA1, TSPAN30), CD73 (ecto-5'-nukleotidaza, SH3, SH4), CD90 (Thy-1), CD105 (endoglin, SH2), CD106 (VCAM-1), CD103 (gp130), CD146 (MCAM), CD133, CD166 (ALCAM), CD200 (MRC, OX2), CD271 (LNGFR, low-affinity nerve growth factor), CD309 (Flk-1, VEGFR-2), ALDH, GD2 (neuralni gangliozi), HSP90beta, integrin αV/β5, SSEA-4 in TNAP (**Preglednica 4**).

Za pozitivno selekcijo se uporablja tudi znana protitelesa, ki še nimajo definiranega antiga, ta so: Stro-1, D7-FIB, W5C5 in MSCA-1 (mesenchymal stem cell antigen-1) (W8B2) (**Preglednica 4**). Izkazalo se je, da je MSCA-1 povezan s CD271 pozitivno populacijo celic iz KM. Te CD271 pozitivne in CD45 negativne celice tvorijo kolonijske enote (CFU, angl. *Colony Forming Unit*) imajo zelo visoko sposobnost proliferacije, ki je višja kot pri populaciji CD271 pozitivnih in CD45 pozitivnih. Zato je MSCA-1 primeren celični označevalci za osamitev MMC z visokim proliferacijskim potencialom (Bühring in sod., 1999). S CD271 označujemo nevralni rastni dejavnik nizke afinitete (LNGFR, angl. *low affinity nerve growth factor receptor*) ali p75 NTR (nevrotropinski receptor, angl. *neurotropin receptor*) na površini MMC. Spada v skupino nevtropinskih receptorjev nizke afinitete in v družino tumor nekroznih receptorjev. Njegovo izražanje so najprej opazili na celicah živčnega sistema. Odgovoren je za razvoj, preživetje in diferenciacijo nevralnih celic (Thomson, 1988). Najdemo ga v centralnem in perifernehm živčnem sistemu na avtonomnih in senzoričnih nevronih (Kashiba in sod., 1995). Nahaja se tudi na celicah glie, tako na oligodendroцитih (Cassaccia-Bonnefil in sod., 1996), astrocitih (Rudge in sod., 1994) in Schwanovih celicah (Di Stefano in Johnson, 1988; Vroemen in Weidner, 2003).

Nato so odkrili da se CD271 izraža tudi na MMC (Caneva in sod., 1995; Quirici in sod., 2002; Jones in sod. 2002), folikularnih dendritičnih celicah (Pezzati in sod., 1992) in mezenhimskih celicah udeleženih v interakciji mezenhima in epitela (Huber in Chao, 1995). CD271 pozitivne celice imajo sposobnost tvorbe CFU in imajo od 10- do 1000-krat višjo sposobnost proliferacije kot MMC, ki jih osamimo z adherenco na plastiko (Quirici in sod., 2002; Jarocha in sod., 2008; Poloni in sod., 2009).

Druga skupina so celični označevalci uporabni pri negativni selekciji, pri kateri označimo neželene celice in jih osamimo iz suspenzije celic, želene celice pa ostanejo neoznačene. Ti celični označevalci so CD11b, CD31 (PECAM-1), CD34 (antigen hematopoetskih progenitorskih celic) in CD45 (skupni levkocitni antigen) ter CD235a (glikoforin A) in Lin⁻ (različni antigeni) (**Preglednica 4**).

Preglednica 4: Celični označevalci, ki so primerni za uporabo za osamitev MMC iz primarnega tkiva.

Celični označevalci	Referenca
Celični označevalci za uporabo pri pozitivni selekciji	
antifibroblastni antigen	Jones in sod., 2002
CD44 (PGP-1, ECMR-3)	Martins in sod. 2009
CD49a (integrin α1)	Deschaseaux in sod., 2003; Gindraux in sod., 2007; Letchford in sod., 2006; Rider in sod., 2007; Stewart in sod., 2003
CD49e (integrin α5)	Baksh in sod., 2003
CD56 (NCAM)	Bühring in sod., 2009; Pittenger in sod., 1999; Sobiesiak in sod., 2010
CD63 (MLA1, TSPAN30)	Stewart in sod., 2003
CD73 (ecto-5'-nukleotidaza, SH3, SH4)	Delorme in sod., 2008; Liu in sod., 2005; Odabas in sod., 2008
CD90 (Thy-1)	Campioni in sod., 2008
CD105 (endoglin, SH2)	Aslan in sod., 2006; Jarocha in sod., 2008; Kastrinaki in sod., 2008; Liu in sod., 2005; Majumdar in sod., 2003; Martins in sod., 2009; Odabas in sod., 2008
CD106 (VCAM-1)	Gronthos in sod., 2003; Gronthos in Zannettino, 2008
CD103 (gp130)	Delorme in sod., 2008
CD146 (MCAM)	Delorme in sod., 2008; Sorrentino in sod., 2008
CD133 (HER-2/erbB2)	Tondreau in sod., 2005
CD166 (ALCAM)	Stewart in sod., 2003
CD200 (MRC, OX2)	Delorme in sod., 2008
CD271 (LNGFR)	Battula in sod., 2009; Bieback in sod., 2009; Bühring in sod., 2007, 2009; Horn in sod., 2008; Jarocha in sod., 2008; Jones in sod., 2006; Poloni in sod., 2009; Qutici in sod. 2002; Sobiesiak in sod., 2010
CD309 (Flk-1, VEGFR-2)	Liu in sod., 2006
ALDH (aldehid dehidrogenaza)	Gentry in sod., 2007
GD2 (neuralni gangliozi)	Martinez in sod., 2007
HSP90beta	Gronthos in sod., 2009
integrin αV/β5	Delorme in sod., 2008
SSEA-4	Gang in sod., 2007
TNAP (alkalna fosfataza)	Battula in sod., 2009; Bühring in sod., 2009; Gronthos in sod., 2007; Sobiesiak in sod., 2010

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Celični označevalci	Referenca
Znana protitelesa, ki še nimajo definiranega antiga za uporabo pri pozitivni selekciji	
Stro-1	Dennis in sod., 2002; Encina in sod., 1999; Gronthos in sod., 1994, 1999, 2003, 2007; Gronthos in Zannettino, 2008; Letchford in sod., 2006; Peiffer in sod., 2007; Psaltis in sod., 2010; Shi in Gronthos, 2003; Simmons in Torok-Storb, 1991; Stewart in sod., 2003; Zannettino in sod., 2007
D7-FIB	Jones in sod., 2002, 2006
W5C5	Bühring in sod., 2007
MSCA-1 (mesenchymal stem cel antigen-1) (W8B2)	Bühring in sod., 1999
Celični označevalci za uporabno pri negativni selekciji	
CD11b	Schrepfer in sod., 2007
CD31 (PECAM-1)	Liu in sod., 2006
CD34 (antigen hematopoetskih progenitorskih celic)	Gronthos in sod., 2007; Huss, 2000; Kaiser in sod., 2007; Liu in sod., 2006; Zannettino in sod., 2007
CD45 (skupni levkocitni antigen)	Baksh in sod., 2007; Jones in sod., 2006; Kaiser in sod., 2007; Kastrinaki in sod., 2008; Kinnaird in sod., 2004; Letchford in sod., 2006; Peiffer in sod., 2007; Tondreau in sod., 2004; Zannettino in sod., 2007
CD235a (glikoforin A)	Letchford in sod., 2006; Peiffer in sod., 2007; Simmons in Torok-Storb, 1991; Tondreau in sod., 2004; Zannettino in sod., 2007
Lin ⁻ (različni antigeni)	Bieback in sod., 2009; Jarocha in sod., 2008; Tondreau in sod., 2004

2.5 UPORABA MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC V MEDICINI

Glavni cilj tkivnega inženirstva in regenerativne medicine je ustvariti nove terapije za zdravljenje različnih poškodb in bolezni, pri katerih telo samo ni sposobno ponovno ustvariti funkcionalnega tkiva. Tkvno inženirstvo se ukvarja z rekonstrukcijo tkiv ali organov z uporabo celic, biomaterialov in bioloških molekul. Regenerativna medicina pa se bolj usmerja v sposobnost samoobnavljanja in uporabo matičnih celic.

MMC so primerne za uporabo v celični terapiji, ker: so lahko dostopne; poznamo dobro definirane metode osamitve in proliferacije in jih lahko v relativno kratkem času namnožimo v primernem številu za klinično uporabo (Colter in sod., 2000; Sekiya in sod., 2002); njihova uporaba ni etično sporna; imajo veliko sposobnost deljenja (Horwitz in sod., 1999); ohranjajo svoj diferenciacijski potencial (Lee in sod., 2005; Kotobuki in sod., 2004); ter ne povzročajo zavrnitvenih reakcij oz. celo delujejo imunosupresivno (Di Nicola in sod., 2002; Ghannam, 2010; Herrero in Perez-Simon, 2010). Razlog za slednjo lastnost je, da MMC na svoji površini nimajo MHC (poglavitni histokompatibilnostni kompleks; angl. *Major Histocompatibility Complex*) razreda II, ampak samo MHC razreda I ob odsotnosti so-stimulirajočih molekul (Le Blanc in sod., 2003). Tako humane MMC niso antigen predstavljene celice in ostanejo nevidne za imunske sisteme gostitelja oz. pacienta (Tse in sod., 2003; Krampera in sod., 2003). Zato lahko MMC uporabljam za alogensko celično terapijo.

Transplantacija MMC je lahko avtologna ali alogenska. Pri avtologni transplantaciji je darovalec in prejemnik ista oseba. Pri alogenski transplantaciji pa uporabljam celice darovalca za zdravljenje genetsko različnega prejemnika. Celice darovalca in prejemnika se razlikujejo v humanih levkocitnih antigenih (HLA), proteinih, ki se nahajajo na levkocitih in so sinonim za MHC pri človeku. Imunski sistem na podlagi HLA razlikuje, kaj je njemu lastno in kaj ni. Zato je pri alogenski transplantaciji nujno ujemanje vsaj v 6 od 10 HLA antigenih med celicami donorja in prejemnika. Kljub temu, da se HLA antigeni ujemajo, obstajajo še vedno nekateri manj znani antigeni, ki lahko sprožijo imunski odziv.

MMC regenerirajo poškodovano tkivo z različnimi mehanizmi, npr. z diferenciacijo celic preko tkivno-specifičnih signalnih poti, s produkcijo rastnih dejavnikov in citokinov (Brittan in sod., 2005) ali z reorganizacijo zunajceličnega matriksa (Schneider in sod., 2008).

Preglednica 5: Nekateri primeri humane terapevtske uporabe MMC (Rastegar in sod., 2010).

Bolezensko stanje	Vir MMC	Način vnosa	Rezultat terapije
Miomardni infarkt	Alogenski KM	Intravenozno	Izboljšanje funkcije praznjenja srca
	Avtologni KM	Intrakoronarno	Izboljšanje funkcije levega ventrikla
Poškodbe hrustanca	Avtologni KM	Mesto poškodbe	Izboljšanje kliničnih simptomov in obsega poškodbe
Lobsteinov sindrom	Alogenski KM	Intravenozno	Pospeševanje rasti
	Fetalne MMC	Intrauterino	Diferenciacija osteoblastov in zmanjšanje poškodbe
Idiopatična aplastična anemija	Alogenski KM	Intravenozno	Izboljšanje strome KM

Zaradi vseh naštetih razlogov, izražanja tropizma za poškodovana tkiva, močnih imunosupresivnih efektov in spodbujanja angiogeneze, imajo MMC ogromen potencial za zdravljenje številnih bolezenskih stanj (Sasaki in sod., 2008; Zhang in sod., 2007; Toma in sod., 2002). Lahko jih uporabimo pri zdravljenju (**Preglednica 5**) poškodb mezenhimskega tkiva, tj. pri zlomih kosti, osteoporosi, obrabi hrustanca ipd. Celice so tudi sposobne transdiferenciacije iz mezoderma v ektoderm; iz njih lahko nastanejo tudi kardiomiociti in živčne celice (astrocyti, nevroni) (Rožman in sod., 2007). Uporabne so tudi v onkologiji, saj tumorji z izločanjem določenih citokinov, tako kot tkivne poškodbe, stimulirajo migracijo MMC proti tumorju. S posegi v poti medsebojne komunikacije MMC in tumorskih celic bi jih lahko uporabili za zdravljenje različnih tumorjev (Nakamura in sod., 2004; Motain in sod., 2010). MMC so do sedaj uporabili v številnih kliničnih študijah, za zdravljenje kardiovaskularnih (Ripa in sod., 2007; Chen in sod., 2004), nevroloških (Lee in sod., 2008; Bang in sod., 2005) in imunomodulatornih bolezni (Lazarus in sod., 2005; Ringden in sod., 2006). Trenutno je registriranih 182 kliničnih študij, ki po vsem svetu ocenjujejo terapevtsko uporabnost MMC (ClinicalTrials, 2011).

Zanimiv primer je uporaba MMC v celični terapiji za zdravljenje ishemij. Migracijske sposobnosti v poškodovano tkivo in sposobnost proliferacije in diferenciacije v različne celične tipe omogoča uporabo MMC za zdravljenje miokardnega infarkta in cerebralne

ishemije. Srčna odpoved še vedno predstavlja velik strošek za zdravstvene zavarovalnice. Trenutne terapije temeljijo le na zmanjševanju in blaženju simptomov. S pomočjo regenerativne medicine so razvili metode nadomeščanja poškodovanega srčnega tkiva z zdravimi celicami. Študije *in vitro* so zelo uspešno pokazale diferenciacijo MMC v kardiomiocite (Makino in sod., 1999; Shiota in sod., 2007). Tako lahko MMC uspešno izboljšajo funkcijo levega ventrikla pri miokardnem infarktu (Grauss in sod., 2008; Amado in sod., 2005). Miyahara in sod. (2006) so pokazali, da transplantacija MMC na mesto poškodbe učinkovito izboljšuje funkcijo srca in statistično značilno vpliva na stopnjo preživelosti podgan z miokardnim infarktom. Ugotovili so, da se nekatere MMC diferencirajo v kardiomiocite, in da MMC z izločanjem citokinov vplivajo na izboljšanje stanja. Citokini, kot spodbujajoči dejavniki angiogeneze, ščitijo celice okoli ishemičnega tkiva (Caplan in Dennis, 2006). MMC z izločanjem citokinov vplivajo na celice sposobne angiogeneze (Noiseux in sod., 2006; Tang in sod., 2010). V dvojno slepi klinični študiji so pokazali, da so pacienti, ki so prejemali intravensko infuzijo MMC, po miokardnem infarktu pokazali statistično značilno izboljšanje kardiovaskularne funkcije (Hare in sod., 2009). O enakih terapevtskih rezultatih poročajo tudi Dill in sod. (2009), ki so uporabili intrakoronarni vnos MMC. Torej sposobnost diferenciacije MMC v kardiomiocite in njihova sekrecija citokinov spodbujata regeneracijo poškodovanega tkiva in s tem funkcijo srca po miokardnem infarktu ter tako povečujeta preživetje in kakovost življenja.

MMC imajo tudi sposobnost diferenciacije v nevronom podobne celice v prisotnosti epidermalnega rastnega dejavnika (EGF, angl. *epidermal growth factor*) ali nevrotrofičnega dejavnika (BDNF, angl. *bone-derived neurotrophic factor*) (Sanchez-Ramos in sod., 2000). Njihova že omenjena lastnost spodbujanja angiogeneze in regeneracija tkiva igra pomembno vlogo pri zdravljenju cerebralne ishemije. V podganjih modelih s cerebralno okluzijo oz. zaporo *A. cerebri medie* (ACM), je aplikacija MMC statistično značilno vplivala na zmanjševanje poškodbe in izboljšanje funkcije tkiva. Aplikacija velikega števila MMC po poškodbi je v primerjavi s postopnim doziranjem pokazala boljše rezultate (Omori in sod., 2008). Omori in sod. (2008) predpostavlja, da so za to odgovorni citokini, ki jih izločajo MMC. MMC tudi vplivajo na pospeševanje proliferacije endogenih nevralnih matičnih celic in branijo novonastale celice pred škodljivim okoljem, ki nastane zaradi ishemije. Poročajo, da so pri miškah z embolično ACM, po transplantaciji MMC v stratum, prav tako uspešno migrirale, preživele in se diferencirale v nevronom podobne celice in s tem vplivajo na povrnitev funkcije tkiva (Li in sod., 2000). Rezultati študij *in vivo* so pokazali, da uporaba MMC vodi v zgodnjo regeneracijo cerebralnega krvnega obtoka in integriteto možgansko krvne bariere po ishemiji (Borlongan in sod., 2004). To daje MMC večjo terapevtsko vlogo. MMC prav tako vplivajo na obnovo nevronov in njihovo remielinizacijo po kapi (Liu in sod., 2008). Obstaja pa veliko načinov vnosa MMC. Pri merjenju dolgotrajnega vpliva regeneracije funkcije tkiva se je v mišjih modelih za študijo kapi intravenozni način izkazal za najboljši način vnosa (Willing in sod., 2003). V klinični študiji, kjer so izvedli avtologno transplantacijo MMC pri 30 pacientih z infarktom ACM in resnimi poškodbami živčevja, so opazili in dokazali statistično značilno izboljšavo poškodbe ob odsotnosti stranskih učinkov (Bang in sod., 2005).

Dobri rezultati kliničnih študij, ki dokazujejo varnost uporabe MMC, dajejo večji pogum za raziskovanje potencialne uporabe MMC za zdravljenja bolezni ljudi. Tako lahko upamo,

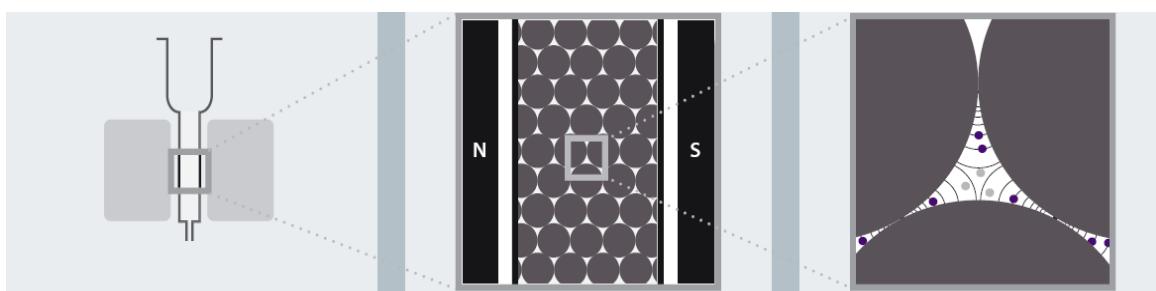
da bo v bližnji prihodnosti uporaba MMC v kliniki vplivali na povečevanje kakovosti življenja pacientov, ki imajo cerebralno ishemijo.

2.6 IMUNOMAGNETNO LOČEVANJE

Imunomagnetno ločevanje postaja pomembna tehnika celične separacije na različnih področjih, od raziskovanja do klinike, od majhnih do velikih volumnov, od velikega števila iskanih celic do redkih celic s specifičnim fenotipom in med različnimi vrstami organizmov. Z uporabo te tehnike lahko osamimo različne tipe celic iz kompleksnih mešanic, kot so periferna kri, hematopoetska tkiva (vranica, limfni vozli, timusa, kostni možeg itd.), nehematopoetska tkiva (trdni tumorji, epidermis, dermis, jetra, ščitnica, mišice, vezivna tkiva, itd.) ali celičnih kultur. Trenutno je na voljo več ločevalnih sistemov, ki se razlikujejo v dveh lastnostih in sicer: sestavi in obliki magnetnih delcev ter načinu ločevanja (pozitivna ali negativna selekcija) (Bosio in sod., 2009).

Eden bolje razširjenih sistemov imunomagnetnega ločevanja je MACS® Technology. Postopek ločevanja temelji na označevanju celic s specifičnimi protitelesi proti določenemu antigenu oz. celičnemu označevalcu. Ta sistem uporablja magnetne delce, posebne separacijske kolone z jekleno matrico in MACS magnetni nosilec, ki ustvarja visoko gradientno magnetno polje (Bosio in sod., 2009; Miltenyi Biotec, 2008b).

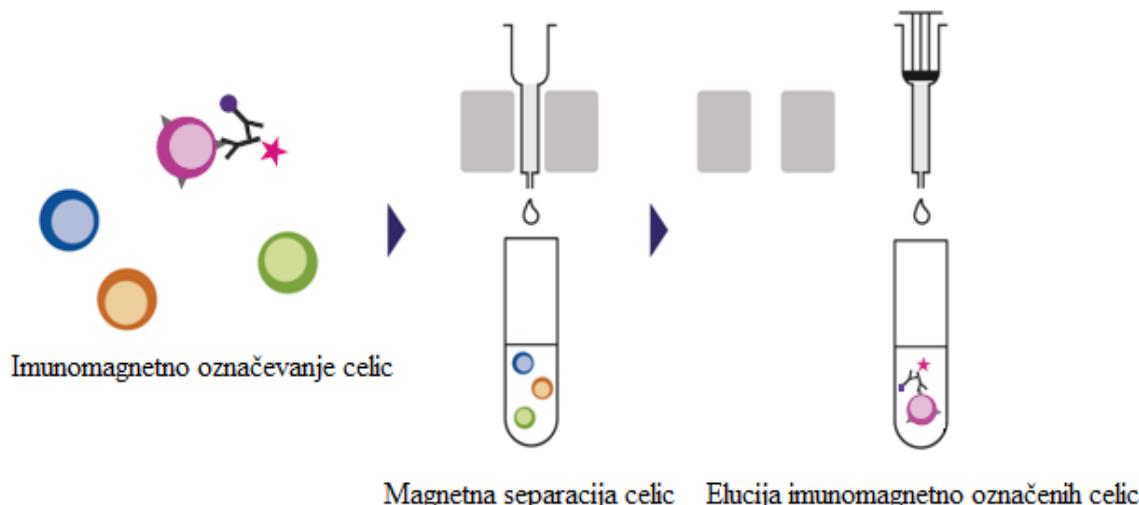
Magnetne delce imenujemo MACS MicroBeads, so super paramagnetni delci biorazgradljivega materiala, ki je mešanica železovega oksida in polisaharidov. Vezani so na specifična protitelesa (neposredno imunomagnetno označevanje) proti specifičnemu celičnemu označevalcu ali proti znački s katero je označeno visoko specifično protitelo za celični označevalec (posredno imunomagnetno označevanje). Razgradijo se in popolnoma izginejo po nekaj dneh gojenja v celični kulturi, kar jih naredi še bolj uporabne, saj ne potrebujejo odstranjevanja z označenih celic. Njihova velikosti je okoli 50 nm. Ne povzročajo znanih vplivov na strukture, funkcijo ali aktivnost označenih celic ter tako ne vplivajo na poskus (Miltenyi Biotec, 2008a, b).



Slika 3: Povečan prikaz jeklenega matriksa kolone s prikazanimi magnetnimi silami (Miltenyi Biotec, 2008a).

MACS kolone imajo v sredini matriks sestavljen iz jeklenih kroglic (Slika 3). Konstruirane so tako, da omogočajo sterilno delo ter hitro in enostavno ločevanje označenih celic. Pri teh kolonah ne smemo uporabljati drugih magnetnih delcev, saj lahko visoke magnetne sile poškodujejo celice. Narejene so za enkratno uporabo in imajo sistem »flow stop«, ki onemogoča izsušitev kolone med dodajanjem tekočin in suspenzije celic. Ko jih postavimo

v MACS magnetni nosilec nastane v matrici (optimalno razporejene jeklene kroglice) visoko gradientno magnetno polje v katerem se na podlagi magnetnih sil ujamejo imunomagnetno označene celice (označene z minimalnim številom magnetnih delcev). Notranjost kolone, je prevlečena s hidrofilnim slojem, ki omogoča hitro polnjenje. Ta sloj se spere ob pripravi kolono s pufrom za spiranje. Obstaja več različnih vrst kolone, ki se razlikujejo po načinu ločevanja (pozitivna ali negativna selekcija) in maksimalnem številu celic, ki jih lahko spustimo skoznjo. Velika prednost te tehnike je, da sta obe frakciji, tako imunomagnetno označenih celic kot neoznačenih celic, takoj pripravljeni za nadaljnjo uporabo, ki je lahko analiza s pretočno citometrijo, nadaljnje molekularne analize, gojenje celic v celičnih kulturah ali celična terapija (Miltenyi Biotec, 2008a, b).



Slika 4: Tristopenjsko ločevanje posredno imunomagnetno označenih celic (Miltenyi Biotec, 2008a).

Pogosteje uporabljeni tehniki so pozitivna selekcija z uporabo posrednega imunomagnetskega označevanja celic, ki poteka v treh korakih. Za izvedbo potrebujemo okoli 30 minut (Slika 4). Uporabna je predvsem za heterogene vzorce z majhnim številom iskanih celičnih tipov, saj omogoča visoko čistost pozitivne frakcije in hitro ločevanje. Prvi korak je magnetno označevanje celic, kjer pripravimo celice in jih označimo s specifičnimi protitelesi proti specifičnemu proteinu oz. celičnemu označevalcu. Na ta protitelesa so neposredno ali posredno vezani magnetni delci, ki so odgovorni za selekcijo v zunanjem magnetnem polju. Običajno se uporablja posredno imunomagnetno označevanje protiteles. Tu v prvi stopnji označimo celični označevalci z visoko specifičnim protitelesom, ki je označeno z značko (običajno fluorokromom npr. R-fikoeritrin (PE), fluorescin izotiacianat (FITC), alofikocianin (APC)). V drugi stopnji uporabimo specifično protitelo z magnetnim delcem, ki prepozna značko. Tako pridobimo suspenzijo imunomagnetno označenih celic. Fluorokromi nam omogočajo sledenje celicam, ki smo jih osamili med postopkom imunomagnetskega ločevanja s pretočno citometrijo (glej poglavje: Pretočna citometrija). Na ta način lahko spremljamo prisotnost označenih celic, čistost populacij celic po ločevanju ter izkoristek oz. učinkovitost imunomagnetskega ločevanja. V tem koraku lahko uporabljamo FcR Blocking Reagent (reagent za blokado FcR), ki povečuje specifičnost vezave protiteles v dvostopenjskem označevanju celic ter s tem povečuje čistost populacije celic po ločevanju. Drugi korak je magnetno ločevanje, ki poteka v kolonah z jekleno matrico v MACS magnetnem nosilcu. V koloni nastane visoko gradientno magnetno polje,

v katerem se na podlagi magnetnih sil ujamejo tudi celice označene z minimalnim številom magnetnih delcev. Neoznačene celice pa neovirano potujejo skozi kolono s tokom pufra. Z enostavnim spiranjem kolone se znebimo velikega števila neoznačenih celic. Tretji korak je eluiranje imunomagnetno označenih celic. V tem koraku odstranimo kolono iz MACS magnetnega nosilca (magnetnega polja) ter s tekočino in batom speremo celice iz kolone (Miltenyi Biotec, 2007a, 2008a).

2.7 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočna citometrija (angl. *Flow Cytometry*), nekateri jo poimenujejo tudi ločevalnik fluorescenčno označenih celic (angl. *FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter*), je občutljiva in ponovljiva tehnika s katero merimo in analiziramo fizikalne in biokemične lastnosti posameznih celic. Vir svetlobe je laserski žarek, ki je usmerjen v tok celic, ki skozi mesto interakcije z laserskim žarkom potujejo posamično v tankem curku. Svetlobni laserski žarek zadene celico, se na njej odbije, lomi ali absorbira na fluorokromih, s katerimi je označena celica. Fluorokormi so barvila, ki absorbirajo svetlobo določene valovne dolžine, oddajo pa svetlobo večje valovne dolžine. Naprava omogoča hitro analizo vzorcev in kakovostno statistično obdelavo rezultatov, saj lahko v eni sekundi analiziramo več sto celic (Kotnik in sod., 2001).

S kombiniranjem specifičnih protiteles označenih z različnimi fluorokromi proti različnim celičnim označevalcem lahko v isti preiskavi kombiniramo več fluorokromskih barvil hkrati, ki jih vzbujamo z eno vrsto svetlobe (npr. Ar laser, 488nm) (**Preglednica 6**), pri tem pa moramo zagotoviti oddajanje svetlobe različnih valovnih dolžin, ki jo razlikujemo s pomočjo fluorescentnih detektorjev. Pri tem je zaželeno čim manjše prekrivanje emisijskih spektrov, kljub temu da je lažno pozitivne rezultate pri večini citometrov možno odstraniti s t.i. metodo kompenzacije. Tako lahko v isti preiskavi ločimo posamezne populacije celic, določimo njihov delež, opazujemo prisotnost specifičnih celičnih označevalcev ipd. (Ihan, 1999).

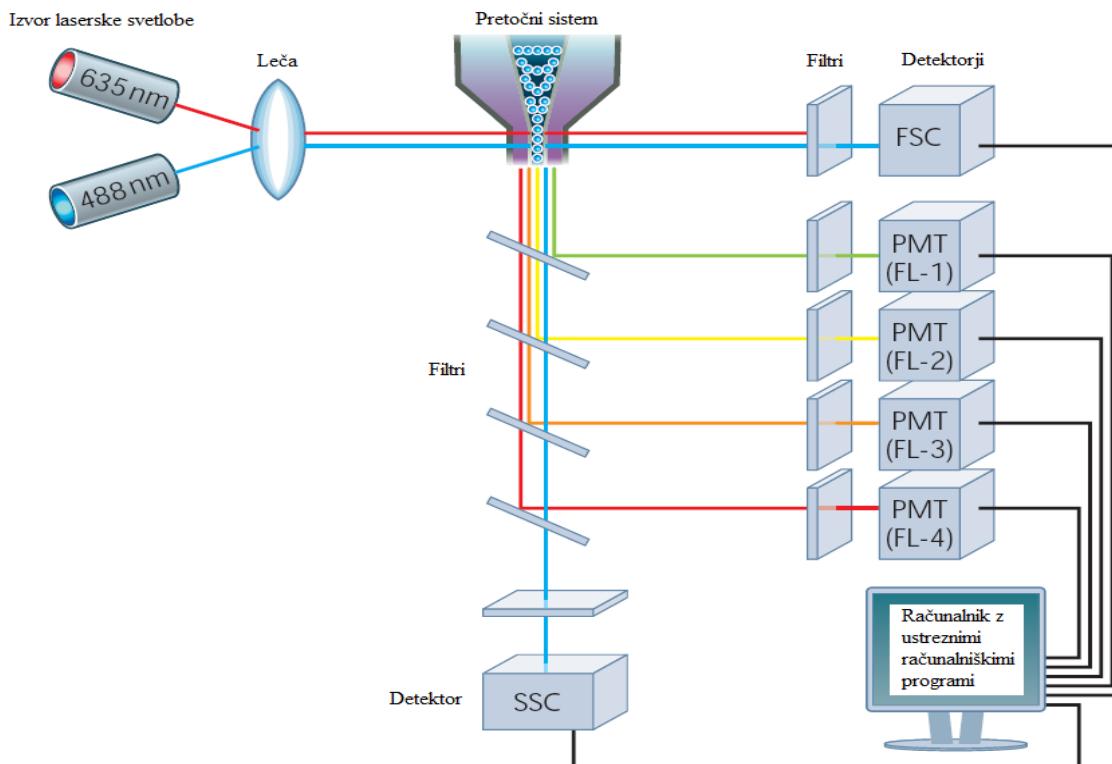
Poleg analize celičnega fenotipa, ki jo uporabljam z ugotavljanjem navzočnosti posameznih celičnih označevalcev na celici ali v njej (kvalitativno in kvantitativno), lahko s pretočnim citometrom izvajamo tudi druge analize (hematološke, onkološke, mikrobiološke, transfuzijološke, itd.). Tako je število parametrov, ki jih lahko zaznavamo, omejeno le z dostopnostjo fluorescenčnih označevalcev in specifike aparatur (valovna dolžina laserja, število detektorjev itd.) (Givan, 2001; Ormerod, 2008).

Glavni sestavni deli pretočnega citometra so: vir svetlobe, pretočni sistem za regulacijo toka nosilne tekočine skozi ustrezeno svetlobo oz. pretočna komora, optični sistem za fokusiranje in usmerjanje svetlobe, elektroda, ki omogoča merjenje intenzitete svetlobe signala in spreminjanje svetlobnega signala v električnega ter računalniški sistem z ustreznim računalniškim programom za analizo in statistično obdelavo dobljenih podatkov (**Slika 5**) (Givan, 2001).

Pretočni citometer ima dva fotodetektorja in od dva do štiri fluorescenčne detektorje. Fotodetektor FSC (angl. *Forward Scatter Channel*) zaznava svetlobo, ki jo celica sipa v smeri od 0° do 20° od smeri laserskega žarka, in količina sprejete svetlobe je odvisna od

velikosti celice. Fotodetektor SSC (angl. *Side Scatter Channel*) zaznava razpršeno svetlobo pravokotno od smeri laserskega žarka. Količina sprejete svetlobe je odvisna od zrnatosti (granuliranosti) celice. Zrnatost celice je odvisna od lastnosti in količine membranskih struktur (lizosomi, endoplazmatski retikulum, fagosomi, citoplazemske in jedrne membrane, ...). Poleg fotodetektorjev FSC in SSC ima pretočni citometer fluorescenčne detektorje (FL1: 530 nm, FL2: 585 nm, FL3: 670 nm in FL4: 661 nm). Pri imunofluorescenčnih tehnikah vzorec obsevamo z vzbujevalno (ekscitacijsko) svetlobo, ki jo fluorokromi s katerimi so označena specifična protitelesa absorbirajo. Fluorescentni detektorji pa merijo relativno intenzitetu oddane (emitirane) svetlobe večjih valovnih dolžin od vzbujene svetlobe. Posamezen fluorescenčni detektor sprejme preko sistema filtrov in zrcal svetlobo določene valovne dolžine in izmeri signal, ki ga odda fluorokrom vezan na celice (preko specifičnega protitelesa). Detektorji sprejmejo svetlobne signale in jih pretvorijo v električne. Te signale izmerimo in obdelamo z ustreznimi računalniškimi programi ter jih prikažemo v obliki točkovnih grafov in/ali histogramov. Iz grafov lahko odčitamo naslednje celične lastnosti: velikosti in zrnatosti ter vrsti in jakosti fluorescenčnih signalov (npr. prisotnost celičnih označevalcev) iz fluorescentnih detektorjev (Rahman, 2011; Ormerod, 2008).

Pretočna citometrija se vedno pogosteje uporablja tako v raziskovalne kot tudi v diagnostične namene. Različne metode pretočne citometrije odvisno od poskusa oz. analize vzorcev izkoriščajo morfološke in biokemijske spremembe celic, ki so značilne za analizirane celice. S številnimi tehnikami pretočne citometrije dobimo veliko podatkov o stanju celic v preiskovanem vzorcu.



Slika 5: Shematični prikaz detektorskega sistema tipičnega pretočnega citometra (PMT-fotopomnoževalka fluorescenčnih detektorjev različnih valovnih dolžin (FL1-4)) (Rahman, 2011).

Preglednica 6: Nekateri najpogosteje uporabljeni fluorokromi za označevanje in podatki o valovnih dolžinah vzbujene in oddane svetlobe (Ormerod, 2008).

Fluorokrom	Absorpcijski max. (nm)	Emisijski max. (nm)	Valovna dolžina laserja (nm) in vzbujevalni ion
Fluorokromi za označevanje proteinov			
FITC (fluorescin izotiacianat)	495	520	488, Argon
PE (R-fikoeritrin)	495, 564	576	
PerCP (peridinin klorofil proteinski kompleks)	490	677	
APC (alofikocianin)	650	660	630, Helij-Neon 647, Kripton
Fluorokromi za označevanje nukleinskih kislin			
PI (propidijev jodid)	342, 535	617	488, Argon
EtBr (etidijev bromid)	320, 518	605	
AO (akridinoranžno)	503	530 (DNA) 640 (RNA)	
7-AAD (7-aminoaktinomicin)	546	647	UV Argon Kripton
Hoechstovo barvilo	395	450	
DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)	372	476	



Slika 6: Pretočni citometer FACSCalibur™ Becton Dickinson (FACSCalibur, 2011).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 LABORATORIJSKA OPREMA, MATERIAL, KEMIKALIJE IN GOJIŠČA

3.1.1 Laboratorijska oprema

- Brezprašna komora (Iskra Pio, Slovenija)
- Celični analizator Vi-CELL XR (Beckman Coulter, ZDA)
- Centrifuga, model 5840R (Eppendorf, Nemčija)
- CO₂ inkubator, model HeraCell 150 (Termo Scientific, ZDA)
- Flourescenčni mikroskop, model Observer 1 (Zeiss, ZDA)
- Hladilnik (+4 °C) (Elektrolux, Švedska)
- Invertni mikroskop, model Eclipse TE300 (Nikon, Japonska)
- Mikropipete (Eppendorf, Nemčija)
- MrFrosty (posoda za počasno zamrzovanje celic) (Nalgene, ZDA)
- Pipetor (angl. *Pipetboy*) (Integra Biosciences, Švica)
- Pretočni citometer, model FACSCalibur™ (Becton Dickinson, ZDA)
- Računalniška oprema MacBiophotonics ImageJ (National Institute of Health, ZDA)
- Računalniški program AxioVision Release 4.7.2 (Zeiss, ZDA)
- Računalniški program CellQuest 3.0.1 in CellQuest Pro 6.0 (BD Bioscience, ZDA)
- Računalniški program NIS Elements D (Nikon, Japonska)
- Stojalo za centrifugirke
- Stresalnik (angl. *vortex*) (IKA Laboratory Equipment, Nemčija),
- Termoblok (Biometra, Nemčija)
- Zamrzovalnik (-20 °C) (Elektrolux, Švedska)
- Zamrzovalnik (-80 °C) (HetoHolten, Danska)

3.1.2 Material

- Centrifugirke (15 in 50 ml) (Corning, ZDA)
- Epruvete z antikoagulantom, 10 ml (BD Vacutainer) (Becton Dickinson, ZDA)
- Epruvete za pretočni citometer, 5 ml (BD Falcon) (Becton Dickinson, ZDA)
- FastRead 102 - števna komora za enkratno uporabo (ISL, Velika Britanija)
- Gojilne posodice, 6 luknjic (površina 9,6 cm²/luknjico) (Nunc, Danska)
- Gojilne posodice, 24 luknjic (površina 2,0 cm²/luknjico) (Nunc, Danska)
- Gojilne posodice, 25 cm² (TPP, Švica)
- Krioviale (Corning, ZDA)
- Krovna stekelca, 1,3 mm (ISOLAB, Nemčija)
- Magnetni nosilec MiniMACS (Miltenyi Biotec, Nemčija)
- Mikrocentrifugirke (Costar, ZDA)
- MS kolone (Miltenyi Biotec, Nemčija)
- Objektna stekelca (Termo Scientific, ZDA)
- Okrogla krovna stekelca, 13 mm (Asistent, Nemčija)
- Pasteurjeva pipeta (3,5 ml) (Ratiolab, Nemčija)
- Pipetni nastavki (10 µl, 100 µl in 1000 µl) (Eppendorf, Nemčija)
- Rokavice (Kimberly-Clark, ZDA)
- Serološke pipete (5, 10, 25 in 50 ml) (Sterilin Limited, Velika Britanija)

- Sterilen filter Minisart 0,2 µm (Sartorius, Nemčija)
- Stojalo za magnetni nosilec MultiStand (Miltenyi Biotec, Nemčija)
- Škatla za krioviale

3.1.3 Kemikalije

- 0,1 % Triton (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 10 % Kozji serum (Invitrogen, ZDA)
- 2 % Srebrov nitrat (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 25 % BSA, goveji serumski albumin (angl. *Bovine Serum Albumin*) (Gibco, ZDA)
- 3,7 % Formaldehid (Merck, Nemčija)
- 70 % Alkohol (Shield Medicare, Velika Britanija)
- Accustain (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Biocid (Shield Medicare, Velika Britanija)
- DAPI, 4,6-diamidino-2-fenilindol (angl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- DMEM/F12, Dulbeccovo modificirano gojišče: hranilna mešanica F12 (angl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium: nutrient mixture F12*) (Gibco, ZDA)
- DMSO, dimetil sulfoksid (angl. *Dimethyl Sulfoxide*) (Sigma, ZDA)
- DPBS, fosfatni pufer brez Ca²⁺ in Mg²⁺ (angl. *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) (Gibco, ZDA)
- EDTA, etilendiaminetetraocetna kislina (angl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*) (Gibco, ZDA)
- FBS, fetalni goveji serum (angl. *Fetal Bovine Serum*) (Gibco, ZDA)
- Glicerol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- hMSC Osteogenic BulletKit (Lonza, ZDA):
 - ✓ Osnovno osteogeno gojišče
 - ✓ Penicilin/Streptomycin
 - ✓ Askorbinska kislina
 - ✓ Deksametazon
 - ✓ Beta glicerolfosfat
 - ✓ FBS
- Izopropanol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Lak za nohte, prozoren
- Lympholyte®-H (Cedarlane, Kanada)
- MSCBM BulletKit (Lonza, ZDA):
 - ✓ MSCBM – osnovno gojišče za MMC (angl. *Mesenchymal Stem Cell Basal Medium*)
 - ✓ MSCGM SingleQuots:
 - MCGS – rastni dodatek za MMC (angl. *Mesenchymal Cell Growth Supplement*)
 - L-Glutamine – L-glutamin
- MSC Research Tool Box - CD271 human (PE) (Miltenyi Biotec, Nemčija):
 - ✓ CD271 MicroBead Kit human (PE):
 - CD271 (LNGFR)-PE, human
 - Anti-PE MicroBeads
 - FcR Blocking Reagent

- ✓ CytoMix-MSC – mešanica citokinov za MMC
- ✓ NHEM – gojišče za MMC (NH Expansion Medium)
- Penicilin/Streptomicin (Invitrogen, ZDA)
- Tripansko modrilo (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Tripsin-EDTA (Gibco, ZDA)
- Želatina (angl. *gelatine*) (Sigma-Aldrich, Velika Britanija)
- Uporabljena protitelesa za pretočno citometrijo:
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgM proti humanemu Stro-1, označeno s FITC (Santa Cruz Biotechnology, ZDA)
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgG₁, κ proti humanemu CD73, označeno s PE (BD Pharmingen, ZDA)
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgG₁, κ proti humanemu CD105, označeno s FITC (BioLegend, ZDA)
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgG₁, κ proti humanemu CD166, označeno s PE (BD Pharmingen, ZDA)
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgG₁, κ proti humanemu CD45, označeno s FITC (BD Pharmingen, ZDA)
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgG₁, proti humanemu CD271, označeno s PE (Miltenyi Biotec, Nemčija)
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgG₁, κ izotipska kontrola, označeno s FITC (BD Pharmingen, ZDA)
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgG₁, κ izotipska kontrola, označeno s PE (BD Pharmingen, ZDA)
- Uporabljena protitelesa za imunobarvanje:
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgG₁, proti humanemu CD105 (Santa Cruz Biotechnology, ZDA)
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgG₁, proti humanemu CD90 (Santa Cruz Biotechnology, ZDA)
 - ✓ Kozje protitelo proti mišjemu IgG₁, označeno s FITC (Invitrogen, ZDA)
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgM, proti humanemu vimentin (Abcam, Velika Britanija)
 - ✓ Kozje protitelo proti mišjemu IgM, oznečeno s Tx (Invitrogen, ZDA)
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgG₁, κ proti humanemu CD73, označeno s PE (BD Pharmingen, ZDA)
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgG₁, κ proti humanemu CD166, označeno s PE (BD Pharmingen, ZDA)
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgG₁, κ proti humanemu CD45, označeno s FITC (BD Pharmingen, ZDA)
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgG₁, κ izotipska kontrola, označeno s FITC (BD Pharmingen, ZDA)
 - ✓ Mišje protitelo razreda IgG₁, κ izotipska kontrola, označeno s PE (BD Pharmingen, ZDA)

3.1.4 Gojišča in raztopine

Za pripravo gojišč in raztopin smo uporabili brezprašno komoro in sterilen material. Če gojišča in raztopine niso bili sterilni, smo jih prefiltrirali skozi sterilen filter Minisart 0,20 µm.

MSCGM (angl. *Mesenchymal Stem Cell Growth Medium*) gojišče za MMC (narejeno po navodilih proizvajalca):

- MSCBM
- MSCGM SingleQuots (MCGS in L-Glutamine)

NHEM Plus gojišče za MMC (narejeno po navodilih proizvajalca):

- NHEM
- CytoMix-MSC

CytoMix je mešanica citokinov za visoko proliferacijo MMC iz različnih virov. Skupaj z NHEM celicam zagotavlja optimalne pogoje za proliferacijo (Miltenyi Biotec, 2008c).

Gojišče, ki podpira osteogeno diferenciacijo (narejeno po navodilih proizvajalca s hMSC Osteogenic BulletKit-om):

- Osnovno osteogeno gojišče
- Penicilin/Streptomicin
- Askorbinska kislina
- Deksametazon
- Beta glicerolfosfat
- 2,5 % oz. 5 % FBS

Kontrolno gojišče za osteodiferenciacijo:

- NHEM Plus za celice gojene v gojišče NHEM Plus ali
- MSCGM za celice gojene v gojišču MSCGM
- Penicilin/Streptomicin

Medij za inaktivacijo tripsina:

- DMEM/F-12
- 10 % FBS

Zamrzovalni medij:

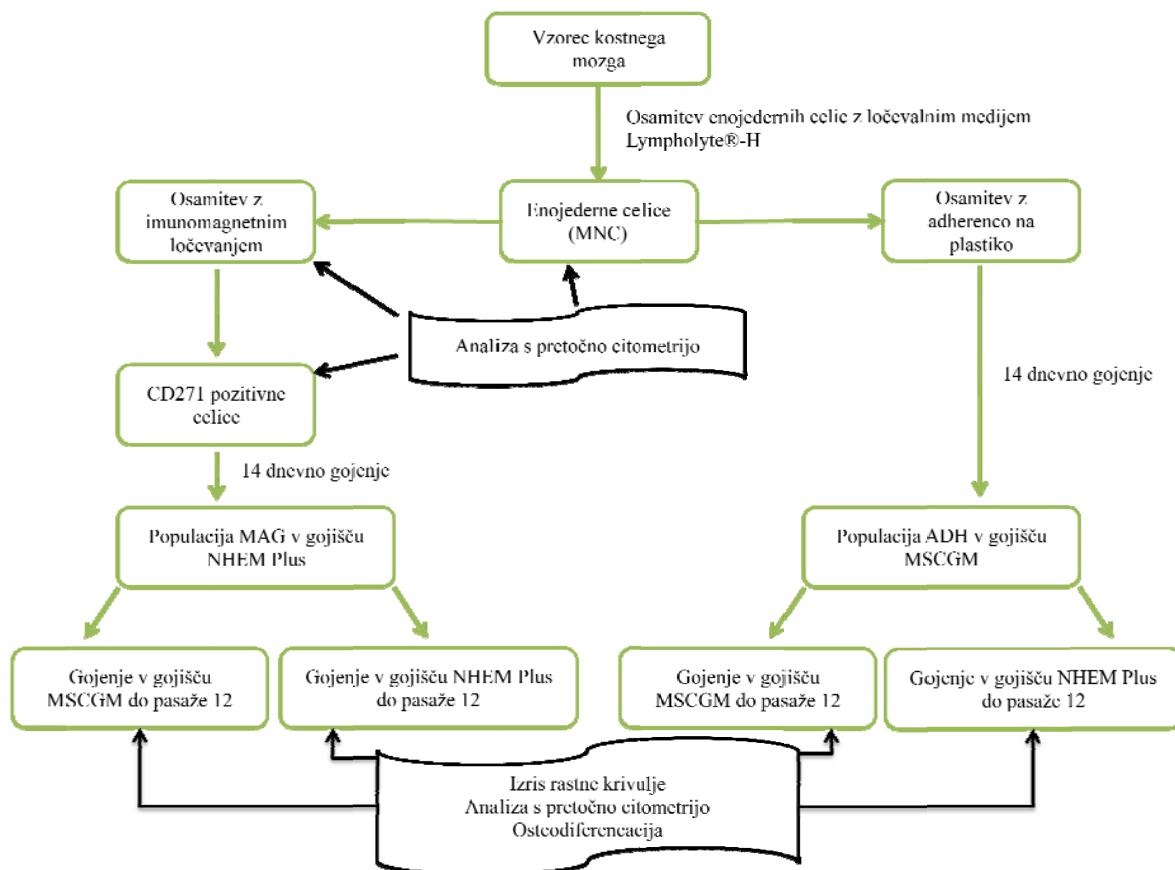
- FBS
- 10 % DMSO

Pufer za spiranje:

- DPBS
- 2 mM EDTA
- 0,5 % BSA

3.2 METODE

Vse poskuse smo skrbno načrtovali in jih izvajali v aseptičnih pogojih. Zato smo si za lažje delo izdelali shemo postopka dela (**Slika 7**).



Slika 7: Shema poteka dela.

3.2.1 Pridobivanje vzorcev kostnega mozga

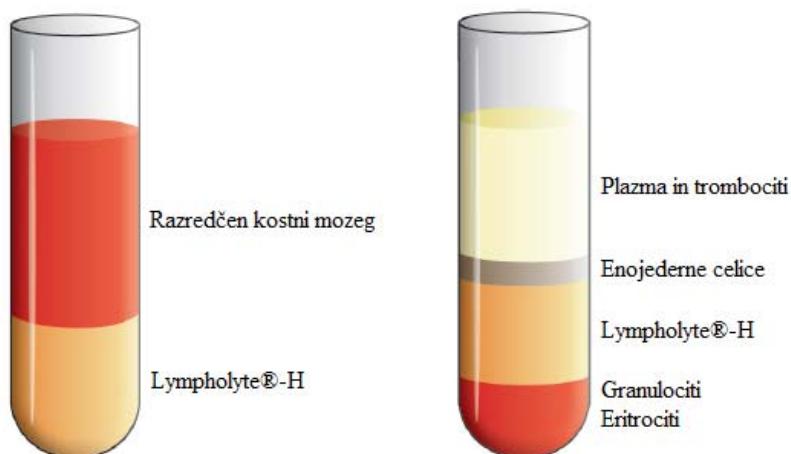
Vzorce KM, iz katerih smo osamili enojedrne celice (MNC, angl. *mononuclear cell*), smo pridobili na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, na Kliničnem oddelku za hematologijo. Punkcijo 4 – 7 ml punktata KM iz križnice je opravil odgovorni zdravnik/ca Kliničnega oddelka za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Punktati KM so bili odvzeti v epruvete z 18,0 mg antikoagulanta K₃EDTA. Vzorci so bili odvzeti pacientom, ki so bili v diagnostičnem postopku in so se strinjali z darovanjem vzorca v raziskovalne namene. To so potrdili s podpisom pristanka (Priloga A) »Izjava o poučenosti in pisni privolitvi v postopek«. Za delo z vzoreci smo dne 13. 7. 2010 pridobili soglasje Komisije za medicinsko etiko številka 128/07/10 za študijo »Uporaba humane matične celice za zdravljenje«.

3.2.2 Osamitev enojedrnih celic

KM vsebuje poleg MC še druge celice: maščobne celice, celice podporne strome, eritrocite, limfocite T in B, granulocite (bazofilce, eozinofilce in nevtrofilce), monocite, makrofage, trombocite in megakariocite.

Da bi ločili MC, ki se nahajajo med MNC, od ostalih celic, smo uporabili osamitev z gradientnim centrifugiranjem s ločevalnim medijem Lympholyte®-H. Lympholyte®-H je poseben ločevalni medij z gostoto $1,0770 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$ pri temperaturi 22°C . Je vodna raztopina s $\text{pH } 6,9 \pm 0,3$ in vsebuje 5,64% polisaharoze 400 in 9,65% natrijevega diatrizonata. Lympholyte®-H se uporablja za specifično ločevanje viabilnih limfocitov in monocitov. Omogoča odstranitev eritrocitov, mrtvih celic in večine granulocitov (tudi nevtrofilce) iz vzorca. Tako po osamitvi dobimo suspenzijo celic, ki vsebuje $\geq 70\%$ živih limfocitov (števila lahko odstopa med vzorci) in $\leq 10\%$ eritrocitov. To lahko dosežemo, če upoštevamo, da je potrebno Lympholyte®-H pred uporabo ogreti na sobno temperaturo (gostota se močno spreminja s temperaturo), dobro premešati in razpliniti (pustimo stati 2-3 minute, da izginejo zračni mehurčki). Končni rezultat ločevanja so plastovito ločeni različni tipi celic iz KM (Cedarlane, 2007).

Z uporabo gradientnega centrifugiranja izkoriščamo razlike v gostoti med MNC in drugimi komponentami KM. Med centrifugiranjem potujejo celice glede na svojo gostoto različno daleč vzdolž vertikalne osi. Lympholyte®-H pri sobni temperaturi povzroča agregacijo eritrocitov in s tem hitrejšo sedimentacijo na dno centrifugirke. Tik nad eritrociti se nahajajo tudi granulociti. Limfociti, monociti in trombociti zaradi svoje majhne gostote ne morejo penetrirati v plast Lympholyte®-H. Zato obstanejo na meji med plazmo in Lympholyte®-H ter so vidni kot moten bel obroček (**Slika 8**). S spiranjem se nato znebimo trombocitov, ostanka plazme in Lympholyte®-H (GE Healthcare, 2010).



Slika 8: Osamitev enojedrnih celic s ločevalnim medijem Lympholyte®-H (GE Healthcare, 2010). Levo je prikazana plast vzorca razredčenega KM nad ločevalnim medijem Lympholyte®-H pred centrifugiranjem. Desno so prikazane ločene plasti različnih celičnih tipov po centrifugiraju.

4 -7 ml vzorca KM smo najprej redčili z DPBS do skupnega volumna 24 ml in ogreli na sobno temperaturo. V štiri 15ml-centrifugirke smo nanesli 3 ml na sobno temperaturo ogretega Lympholyte®-H ter nanj previdno nanesli 6 ml vzorca razredčenega KM. Med nanašanjem smo pazili, da se nam sloja nista pomešala. Tako pripravljene centrifugirke smo centrifugirali 30 minut pri $400 \times g$ na sobni temperaturi z minimalnim pospeševanjem in brez zaviranja. Po centrifugiranju smo s Pasteurjevo pipeto previdno odstranili plast MNC in jih prenesli v novo 50ml-centrifugirko. Dodali smo DPBS do skupnega volumna 50 ml in centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$ na sobni temperaturi, tako smo sprali celice. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in MNC resuspendirali v 1 ml pufra za spiranje ter določili število celic, ki smo jih osamili (glej poglavje: Določanje števila celic). Z dobljeno suspenzijo MNC smo nadaljevali s primerjavo metod osamitve (glej poglavje: Primerjava metod osamitve).

3.2.3 Določanje števila celic

Za določanje števila celic smo uporabili dve različni metodi opisani v nadaljevanju. Uporabili smo ju odvisno od količine vzorca in eksperimenta, ki smo ga izvajali.

Za vzorce, ki so vsebovali zadostno število celic, smo za določanje števila celic uporabili napravo Vi-Cell XR. Ta naprava omogoča samodejno štetje celic ter izvede oceno njihove viabilnosti na podlagi barvanja s tripanskim modrilom. Ker se tipi celic med seboj razlikujejo, smo prilagodili parametre, potrebne za učinkovito določevanje števila celic in oceno njihove viabilnosti. Za določanje števila celic v vzorcu KM smo ustvarili nov profil (**Preglednica 7**).

Preglednica 7: Uporabljeni parametri za določanje števila celic na napravi Vi-Cell XR.

Parameter	Velikost parametra
Minimalni premer celice [μm]	4
Maksimalni premer celice [μm]	10
Svetlost celice [%]	85
Ostrina celice [%]	100
Svetlost viabilne celice [%]	65
Površina svetle točke viabilne celice [%]	5

Za vzorec, ki so vsebovali majhno število celic, smo za določanje števila celic uporabili števne komore za enkratno uporabo FastRead 102. Ploščica je sestavljena iz desetih enakih komor. V vsaki komori je vgravirana mrežica, sestavljena iz 10 velikih kvadratov, vsak kvadrat pa je razdeljen na 16 manjših kvadratov. Volumen vzorca, ki ga sprejme komora je $9 \mu\text{L}$. Število celic določimo z izračunom po spodnji formuli.

$$\text{št. celic/ml} = \frac{\text{prešteto št. celic}}{\text{št. velikih kvadratov}} \times 10^4 \times \text{redčitev vzorca} \quad \dots(1)$$

Vzorec, kateremu smo določali število celic, smo predhodno po potrebi redčili. Razredčen vzorec pa smo nato v razmerju 1:1 redčili še s tripanskim modrilom ter ga dobro premešali. $10 \mu\text{l}$ vzorca smo prenesli v komoro, kjer je višek volumna odtekel v stranske kanale. Tako pripravljen vzorec smo nato prešteli na mikroskopu pri $100 \times$ povečavi. Prešteli smo samo

žive celice, torej neobarvane celice. Tripansko modrilo mrtve celice obarva modro. Tako jih lahko ločimo od živih celic, ki ostanejo neobarvane.

3.2.4 Primerjava metod osamitve

Za učinkovito primerjavo osamitve populacij MMC z imunomagnetnim ločevanjem in klasično osamitvijo z adherenco na plastiko, moramo imeti dobro standardizirane pogoje za primerjavo. Da smo se izognili nepotrebnim neznankam in neenakovrednim pogojem, smo primerjali obe metodi osamitve na nivoju posameznega vzorca KM. Zato smo potrebovali zadostno količino začetnega vzorca KM, da smo pridobili zadostno število MNC.

Za vsako metodo osamitve smo (imunomagnetno ločevanje in adherenco na plastiko) iz homogenizirane suspenzije MNC istega KM vzeli 3×10^7 MNC. To število nam omogoča, da lahko po imunomagnetnem ločevanju nasadimo celice v zadostnem številu za nadaljnjo gojenje.

Populacije MMC, ki smo jih osamili, smo gojili 14 dni in jim na 7 dni menjali gojišče. Po 14 dnevnom gojenju smo primerjali rezultat obeh metod osamitve.

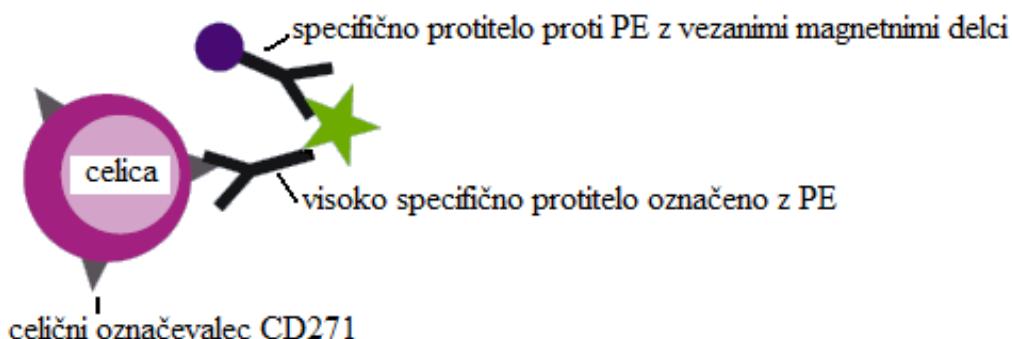
Primerjavo metod osamitve smo izvedli na več različnih bioloških ponovitvah oz. vzorcih KM. Tako so dobljeni podatki dobili tudi statistično vrednost.

3.2.4.1 Imunomagnetno ločevanje

Za imunomagnetno ločevanje smo uporabili komercialni komplet reagentov CD271 MicroBead, human (PE). Uporablja se za pozitivno selekcijo imunomagnetno označenih humanih celic iz suspenzije MNC, ki imajo na površini prisoten celični označevalc CD271 (**Slika 9**). Viri MNC so lahko kostni mozeg, lipoaspirat, periferna krvi, limfocitni pripravek in popkovnična kri. Princip ločevanja temelji na predhodno opisanih treh korakih. V prvem tako imenovanem koraku imunomagnetnega označevanja posredno označimo CD271 pozitivne celice. To naredimo v dveh stopnjah. V prvi stopnji označimo celice s protitelesi CD271-PE, ki so visoko specifična proti celičnemu označevalcu CD271 in imajo vezan fluorokrom PE. Na fluorokrom nato v drugi stopnji vežemo protitelesa Anti-PE MicroBeads, ki so visoko specifična proti PE z vezanimi magnetni delci. Ti magnetni delci pa so odgovorni za ločevanje. Pri obeh stopnjah označevanja celic uporabljan je tudi reagent za blokado FcR iz zgoraj opisanih razlogov. Tako imunomagnetno označene celice nanesemo na predhodno pripravljeno MS kolono (kolono navlažimo s pufrom za spiranje), ki je postavljena v magnetni nosilec MiniMACS. Neoznačene celice se iz kolone sperejo. Zaradi magnetnih delcev CD271 pozitivne celice po magnetni selekciji ostanejo v koloni, ki jih izven magnetnega polja z batom in pufrom za spiranje potisnemo iz nje. Po tej stopnji dobimo dobro prečiščeno populacijo CD271 pozitivnih celic (Miltenyi Biotec, 2007a, b).

Najprej smo si pripravili pufer za spiranje in ga ohladili na 4 °C. Na enaki temperaturi imamo tudi shranjene komponente kompleta reagentov CD271 MicroBead, human (PE): CD271-PE, Anti-PE in reagent za blokado FcR.

S celicami delamo hitro, jih ohranjamo hladne in uporabljamo predhodno ohlajene reagente. S tem preprečimo nespecifične vezave protiteles na celice in med protitelesi. Pazimo, da vzorci MNC ne vsebujejo skupkov, ki bi zamašili kolono in s tem zmanjšali učinkovitost ločevanja. Protokol smo prilagodili za 3×10^7 MNC tako, da smo prilagodili volumen reagentov in velikost kolone.



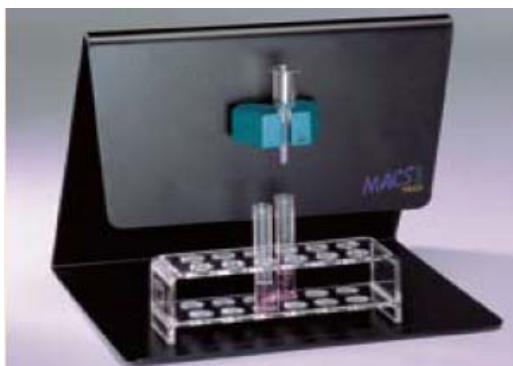
Slika 9: Posredno imunomagnetno označena celica za celični označevalec CD271 (Miltenyi Biotec, 2008b).

3.2.4.1.1 Imunomagnetno označevanje celic

Iz suspenzije MNC smo odvzeli ustrezen volumen celične suspenzije tako, da smo v novo 15-ml centrifugirko prenesli 3×10^7 MNC. To smo centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$ na $4^\circ C$. Po centrifugiranju smo povsem odstranili supernatant in pelet resuspendirali v 240 μl pufra za spiranje. Celični suspenziji smo dodali 30 μl reagenta za blokado FcR in 30 μl protitelesa CD271-PE. Vse skupaj smo dobro premešali in inkubirali 10 minut na $4^\circ C$. Po inkubaciji smo v centrifugirko dodali 10 ml pufra za spiranje in centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$ na $4^\circ C$. Po centrifugiranju smo povsem odstranili supernatant in pelet resuspendirali v 210 μl pufra za spiranje. Celični suspenziji smo dodali 30 μl reagenta za blokado FcR in 60 μl protiteles z vezanimi magnetnimi delci Anti-PE MicroBead. Vse skupaj smo dobro premešali in inkubirali 15 minut na $4^\circ C$. Po inkubaciji smo v centrifugirko dodali 10 ml pufra za spiranje in centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$ na $4^\circ C$. Po centrifugiranju smo povsem odstranili supernatant in pelet resuspendirali v 500 μl pufra za spiranje (Miltenyi Biotec, 2007a).

3.2.4.1.2 Magnetna separacija celic

Za magnetno separacijo smo izbrali MS kolono (**Slika 10**), ki je primerna za pozitivno selekcijo redkih imunomagnetno označenih celic iz heterogene suspenzije. Zasnovana je tako, da sprejme do 10^7 označenih celic in 2×10^8 vseh celic. Pri delu s kolono moramo paziti, da jo postavimo v magnetni nosilec, pod njem pa namestimo zbirno 15-ml centrifugirko tako, da se konec kolone in vrh centrifugirke ne dotikata, saj mora tekočina prosto kapljati iz kolone v zbirno centrifugirko. Pri dodajanju nove tekoče faze oziroma suspenzije celic moramo paziti, da v tekočini ni mehurčkov, saj le ti motijo ločevanje in tok tekočine skozi kolono ter počakati, da tekočina neha kapljati iz kolone. Pri tem ne smemo uporabljati sile (Miltenyi Biotec, 2007a).



Slika 10: MS kolona v magnetnem nosilcu MiniMACS pritrjen na MultiStand stojalu za magnetni nosilec (Miltenyi Biotec, 2008a).

Pravilno postavljeni MS kolono smo najprej pripravili tako, da smo jo sprali s 500 µl pufra za spiranje in nanjo nanesli pripravljeno suspenzijo MNC. Kolono smo nato še trikrat sprali s 500 µl pufra za spiranje. Iz kolone smo tako odstranili neoznačeno frakcijo MNC. Kolono smo vzeli iz magneta in jo postavili v novo zbirno centrifugirko. Sprali smo jo z 1 ml ogretega gojišča NH Expansion Medium (NHEM). Ponovno smo dodali 1 ml ogretega gojišča NHEM in z batom počasi po kapljicah potisnili CD271 pozitivne celice iz kolone (Miltenyi Biotec, 2007a).

Za določanje števila celic s števno komoro za enkratno uporabo FastRead 102 smo porabili 10 µl suspenzije (glej poglavje: Določanje števila celic). Dobljenih 2 ml suspenzije CD271 pozitivnih celic smo nasadili v eno luknjico gojilne posodice s 6 luknjicami (površin 9,6 cm²). Celicam smo po 7 dneh zamenjali gojišče in jih po 14 dneh tripsinizirali ter prešteli z uporabo števne komore za enkratno uporabo FastRead 102. S pridobljenim podatkom smo lahko primerjali metodi osamitve.

Dobljeno populacijo MMC, ki smo jo osamili z imunomagnetskim ločevanjem (populacija MAG), smo uporabili za primerjavo rasti populacij, ki smo jih osamili (glej poglavje: Primerjava rasti različnih populacij MMC).

3.2.4.1.3 Izračun izkoristka imunomagnetnega ločevanja

Pri delu nas je zanimal tudi izkoristek imunomagnetnega ločevanja, ki smo ga izračunali za vzorce KM67, KM68, KM 69, KM72 in KM77 po naslednji formuli:

$$\text{izkoristek (\%)} = \frac{(\text{delež CD271 pozitivnih celic po izolaciji} \times \text{št. celic po izolaciji})}{(\text{delež CD271 pozitivnih celic pred izolacijo} \times \text{št. celic pred izolacijo})} \times 100 \quad \dots(3)$$

3.2.4.2 Klasična osamitev z adherenco na plastiko

Metoda temelji na adherentnem potencialu MMC, saj se MMC pritrdijo na plastiko v času 24-72 h (Nardi in Meirelles, 2006).

Iz suspenzije MNC smo odvzeli ustrezен volumen celične suspenzije tako, da smo v novo 15ml-centrifugirko prenesli 3×10^7 MNC. To smo centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$ na 4

°C. Po centrifugiraju smo povsem odstranili supernatant in pelet resuspendirali v 12 ml ogretega gojišča MSCGM (angl. *Mesenchymal Stem Cell Growth Medium*). Suspenzijo celic smo dobro premešali in nasadili v 6 luknjic v gojilno posodico s 6 luknjicami (površina luknjice: 9,6 cm²) po 2 ml celične suspenzije na luknjico, saj je nasaditvena gostota 500.000 celic/cm².

Ker so nas zanimali samo adherentne celice, ki predstavljajo populacijo MMC, smo se neadherentnih celic znebili z menjavo gojišča po 48 urah gojenja. Celicam smo po 7 dneh zamenjali gojišče in jih po 14 dneh tripsinizirali ter prešteli z uporabo števne komore za enkratno uporabo FastRead 102. S pridobljenim podatkom smo lahko primerjali metodi osamitve.

Dobljeno populacijo MMC, ki smo jo osamili z adherenco na plastiko (populacija ADH), smo uporabili za primerjavo rasti izoliranih populacij (glej poglavje: Primerjava rasti različnih populacij MMC).

3.2.5 Dohranjevanje celične kulture

Rast celične kulture smo spremajali vsak dan in jim glede za poskus, ki smo ga izvajali, zamenjali ustrezno gojišče (glej poglavje: Gojišča in raztopine). Če smo celice samo gojili, smo jim ustrezno gojišče menjali 1-krat tedensko. Menjavo gojišča smo izvedli tako, da smo izrabljenega zamenjali z ustreznim volumnom svežega. Volumen svežega gojišča je bil odvisen od velikosti gojilne posodice, ki smo jo uporabili za gojenje celic. Gojišča MSCGM, NHEM in NHEM Plus smo pripravljali po navodilih proizvajalca (glej poglavje: Gojišča in raztopine). Vsako gojišče smo po pripravi alikvotirali v manjše volumne in jih shranili v zamrzovalniku na -20 °C. Delovne volumne smo sproti odtajali in jih shranili v hladilniku na 4 °C. Tako gojišče je uporabno 1 teden.

3.2.6 Tripsinizacija

Tripsinizacija je postopek s katerim odlepimo enoslojno celično kulturo iz dna gojilne posodice z encimom tripsin, ki razgraje peptidne vezi med proteini, ki pritrjujejo celice na podlago. Celic ne smemo pustiti izpostavljenih tripsinu dlje kot 10 minut. Pri višjem času izpostavitve, tripsin spreminja proteine na površini celic in razgraje celice.

MMC presajamo v novo gojilno posodico, ko le te dosežejo 70 - 90% konfluenco oz. preraščenost gojilne posodice.

Tripsin smo najprej ogreli na 37 °C, saj je ta temperatura optimalna za njegovo delovanje. Iz gojilne posodice smo odstranili izrabljeno gojišče. Celice smo nato 3-krat zaporedno sprali z na sobno temperaturo ogretim D-PBS ob počasnem vrtenju gojilne posodice. S tem smo s celic dobro sprali komponente gojišča, saj serum inhibira delovanje tripsina. Po zadnjem spiranju z D-PBS smo dodali ustrezen volumen tripsina (**Preglednica 8**) ter gojilno posodico za 5 minut postavili v inkubator na 37 °C. Po inkubaciji smo pod mikroskopom preverili ali je bila tripsinizacija uspešna, torej ali so se vse celice odlepile s podlage. Če se celice niso povsem odlepile, smo postavili gojilno posodico za kratek čas na stresalnik. Ko so se vse celice odlepile s podlage in smo dobili suspenzijo posamičnih

celic, smo jim dodali 2-kratni volumen ogretega medija za inaktivacijo tripsina (glej poglavje: Gojišča in raztopine) s katerim smo ustavili delovanje tripsina ter sprali gojilno posodico. Suspenzijo smo prenesli v 15-ml centrifugirko in centrifugirali 5 minut pri $400 \times g$ na sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo povsem odstranili supernatant in pelet resuspendirali v ustreznem gojišču ali raztopini, odvisno od nadaljevanja poskusa.

Preglednica 8: Uporabljeni volumni kemikalij glede na velikost gojilne posodice.

Gojilna posodica (GP)	V_{DPBS}	$V_{tripsin}$	$V_{\text{medij za inaktivacijo tripsina}}$
GP, 25 cm^2	4 ml	3 ml	6 ml
GP s 6 luknjicami, $9,6 \text{ cm}^2$	2 ml	1,5 ml	3 ml

3.2.7 Shranjevanje celic

Celice, ki jih nismo potrebovali za nadaljnje poskuse, smo zamrznili in shranili v zamrzovalniku na -80°C . Volumen zamrzovalnega medija je bil odvisen od števila celic, ki smo jih namenili za shranjevanje (**Preglednica 9**).

Preglednica 9: Volumen zamrzovalnega medija v odvisnosti od števila celic

Število celic	$V_{\text{zamrzovalni medij}}$
100.000 – 500.000	0,5 ml
500.000 – 1.000.000	1,0 ml
1.000.000 – 3.000.000	2,0 ml

Predhodno smo si pripravili polovico predvidenega volumna zamrzovalnega medija v razmerju 20% DMSO in 80% FBS ter preostalo polovico FBS ter ju skupaj s posodo za zamrzovanje (Mr. Frosty) ohladili v hladilniku na 4°C . Nato smo določili skupno število celic, ki jih nismo potrebovali in se odločili, koliko in v kolikšnem volumnu jih želimo zamrzniti v posamezni krioviali. Volumen suspenzije celic, ki smo jo namenili za shranjevanje smo prestavili v 15-ml centrifugirko in centrifugirali 5 minut pri $400 \times g$ na 4°C . Pri zamrzovanju je zelo pomembno, da imamo vse kemikalije, ki jih uporabljamo in suspenzijo celic čim bolj ohlajene, saj s tem preprečimo toksično delovanje DMSO na celice. Po centrifugiranju smo povsem odstranili supernatant in pelet previdno resuspendirali v predvidenem volumnu FBS. Ko smo dobili homogeno suspenzijo celic, smo previdno dodali še predvideni volumen pripravljenega zamrzovalnega medija. Tako smo pridobili suspenzijo celic v zamrzovalnem mediju v razmerju 10% DMSO in 90% FBS (glej poglavje: Gojišča in raztopine). Dobljeno suspenzijo celic smo prenesli v ohlajene krioviale, jih dali v ohlajeno posodo za zamrzovanje ter vse skupaj čez noč pustili v zamrzovalniku pri -80°C . Po 24 h smo prestavili krioviale v škatlo za krioviale in pustili v zamrzovalniku pri -80°C . Za dolgoročno shranjevanje smo celice prenesli v tekoči dušik na -196°C .

3.2.8 Primerjava rasti različnih populacij MMC

Naš namen je bil poiskati najprimernejšo kombinacijo populacij ADH in MAG ter gojišča MSCGM in NHEM Plus.

Rast izoliranih populacij ADH in MAG smo pripravljali tako, da smo izrisali njihove rastne krivulje. Uporabili smo gojenje v gojilnih posodicah s 6 luknjicami, tripsiniziranje in štetje s uporabo števne komore za enkratno uporabo FastRead 102 (glej poglavje: Določanje števila celic).

3.2.8.1 Gojenje populacij

Populaciji ADH in MAG, ki smo ju pridobili po 14 dnevnom gojenju, smo razdelili na dva dela. En del populacije smo uporabili za gojenje v gojišču MSCGM. Drugi del za gojenje v gojišču NHEM Plus. Celice smo gojili v 3 tehničnih ponovitvah za vsako kombinacijo populacije in gojišča posebej. Nasaditvena gostota celic je bila med 4.000 in 5.000 celic/cm². Da smo lahko primerjali vse štiri kombinacije med seboj, je morala biti nasaditvena gostota v tekoči pasaži enaka med vsemi kombinacijami. Prav tako smo zaradi primerjave kombinacij celične kulture tripsinizirali in prešteli, ko je prva izmed kombinacije dosegla 70 - 90% konfluenco. Vsako luknjico vseh kombinacij smo tripsinizirali posebej in iz vsake centrifugirke vzeli po tri vzorce za štetje ter za vsak vzorec izvedli 2 ponovitvi štetja z uporabo števne komore za enkratno uporabo FastRead 102. Tako smo odstranili možne napake pri jemanju vzorcev in štetju (**Preglednica 10**).

Po štetju smo združili vse 3 tehnične ponovitve vsake kombinacije in ponovno nasadili celice v 3 tehničnih ponovitvah v nasaditveni gostoti 4000 - 5000 celic/cm². Zopet pazimo da je nasaditvena gostota med vsemi kombinacijami tekoče pasaže enaka. Celične kulture smo tripsinizirali in prešteli, ko je prva izmed kombinacije dosegla 70 - 90% konfluenco. Vsako luknjico vseh kombinacij smo tripsinizirali posebej in iz vsake centrifugirke vzeli po tri vzorce za štetje ter za vsak vzorec izvedli 2 ponovitvi štetja z uporabo števne komore za enkratno uporabo FastRead 102 ter izračunali njuno povprečje. Tako smo za vsako kombinacijo tekoče pasaže dobili število celic, zraslih v posamezni luknjici za vse tri tehnične ponovitve. Celice, ki jih nismo potrebovali za nadaljnje poskuse, smo zamrznili in shranili v zamrzovalniku na -80 °C (glej poglavje: Shranjevanje celic). Ta korak smo ponavljali do poljubne pasaže, do katere smo gledali primerjavo med kombinacijami (med 7 in 13 pasaž).

Preglednica 10: Shema gojenja populacije ADH in MAG v gojilni posodici s 6 luknjicami.

Populacija ADH po 14 dneh gojenja v gojišču MSCGM		Populacija MAG po 14 dneh gojenja v gojišču NHEM Plus	
potrebujemo 288.000 celic (6 × 48 000 celic/luknjico)		potrebujemo 288.000 celic (6 × 48.000 celic/luknjico)	
MSCGM	NHEM Plus	MSCGM	NHEM Plus
3 × 48.000 celic/luknjico	3 × 48.000 celic/luknjico	3 × 48.000 celic/luknjico	3 × 48.000 celic/luknjico
Celice tripsiniziramo in prestejemo, ko je prva luknjica med kombinacijami dosegla 70 - 90% konfluenco. Celice nasadimo naprej in višek celic zamrznemo.			

3.2.8.2 Izris rastne krivulje

Med presajanjem celic smo si za vsako kombinacijo za vse 3 tehnične ponovitve zapisovali izračunano število celic, zraslih v posamezni luknjici. Tako smo dobili za vsako pasažo

vsake kombinacije tri podatke o številu celic. Med gojenjem smo si tudi zapisovali čas med pasažami.

Najprej smo za pasaže, za katere smo nasadili manj kot 5.000 celic/cm^2 , po sklepnu računu preračunali, koliko celic bi zraslo, če bi nasadili 5.000 celic/cm^2 . Iz tehničnih ponovitev smo izločili podatke o številu zraslih celic, ki so odstopali od ostalih dveh in izračunali njihovo povprečje. Tako smo si pripravili podatke za izračun teoretičnega števila zraslih celic v določeni pasaži. Torej računali smo, kot da bi nasadili v naslednjo pasažo vse celice, zrasle v določeni pasaži; od pasaže 1 do zadnje uporabljene pasaže za izris rastne krivulje. Teoretično število zraslih celic na posamezno pasažo smo izračunali po naslednji formuli:

$$\text{teor. št. zraslih celic v pasaži}_x = \frac{\text{povpr.št.zraslih celic v pasaži}_x \times \text{teor.št.zraslih celic v pasaži}_{x-1}}{\text{št.nasajenih celic}} \quad \dots(2)$$

Iz dobljenih teoretičnih dobitkov celic za posamezno pasažo in časa v dnevih, ki so pretekli med pasažami, smo v programu Microsoft Office Excel 2007 izrisali grafe število celic v odvisnosti od časa v dnevih.

3.2.9 Osteodiferenciacija

Osteodiferenciacijo smo preverjali pri vzorci KM72 in KM73 med gojenjem MMC. Preverjali smo jo v pasažah 3, 7, 10 za KM72 in 3, 7, 11 in 14 za KM73 za vsako kombinacijo izolirane populacije ADH in MAG ter gojišča MSCGM in NHEM Plus. Za osteodiferenciacijo smo uporabili celice, ki jih nismo porabili za nadaljnjo nasajevanje pri poskusu rastnih krivulj.

3.2.9.1 Gojenje celic različnih kombinacij

Celice smo nasadili v nasaditveni gostoti 5.000 celic/cm^2 . Zaradi pomanjkanja števila celic smo namesto zaželenih 3 tehničnih ponovitev naredili le 1 tehnično ponovitev. Za vsako kombinacijo smo potrebovali dve luknjici v gojilni posodici s 24 luknjicami (**Preglednica 11**). Ena luknjica je služila za test osteodiferenciacije, druga je bila negativna kontrola. Ustrezni volumen suspenzije celic, ki vsebuje 20.000 celic (za vsako kombinacijo smo potrebovali 10.000 celic), smo prestavili v 15-ml centrifugirko in centrifugirali 5 minut pri $400 \times g$ na sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo povsem odstranili supernatant in pelet previdno resuspendirali v enakem gojišču, kot je bila gojena kombinacija. Celice smo gojili 1 – 2 dni, da so se dobro pritrstile in luknjicam, ki so bile namenjene osteodiferenciaciji zamenjali gojišče z gojiščem, ki podpira osteogeno diferenciacijo (glej poglavje: Gojišča in raztopine). Gojišče, ki podpira osteogeno diferenciacijo in ustrezeno gojišče za negativno kontrolo smo vsem kombinacijam menjali 2-krat tedensko. Za prvi dve menjavi smo uporabili gojišče, ki podpira osteogeno diferenciacijo s 5% seruma, pri naslednjih menjavah pa smo zmanjšali delež seruma na 2,5%. Celice smo gojili 21 dni in jih pobarvali.

Preglednica 11: Shematski prikaz razporeditve vseh štirih kombinacij za osteodiferenciacijo.

	Kombinacija populacije ADH in MAG ter gojišča MSCGM in NHEM Plus			
	ADH-MSCGM	ADH-NHEM Plus	MAG-MSCGM	MAG-NHEM Plus
Osteodiferenciacija	Gojišče, ki podpira osteogeno diferenciacijo			
Negativna kontrola	Gojišče MSCGM	Gojišče NHEM Plus	Gojišče MSCGM	Gojišče NHEM Plus

3.2.9.2 Barvanje von Kossa

MMC se diferencirajo v osteocite oz. zrele kostne celice. Te celice izločajo v matriks poleg kolagena I in drugih proteinov tudi veliko kalcijevega fosfata. Ta se v matriksu nahaja v obliki kristalov hidroksiapatita, ki daje kosti trdnost in togost. Za določanje prisotnosti kalcijevega fosfata in karbonata uporabljamo von Kossa barvanje. Pri tem barvanju srebro v srebrovem nitratu zamenja kalcij v kalcijevih soleh. Nastala srebrova sol se pod vplivom močne svetlobe reducira in izloči se elementarno srebro, ki je temne barve.

Odstranili smo gojišče in 2-krat previdno sprali celice s hladnim DPBS. Celice smo najprej 15 minut fiksirali s fiksirnim sredstvom Accustain ter jih 2-krat sprali z destilirano vodo. Destilirano vodo uporabimo zato, ker ne vsebuje ionov. DPBS pa vsebuje dvovalentne ione, ki enako kot kalcijeve soli reagirajo s srebrovim nitratom. Dodali smo 2% raztopino srebrovega nitrata in inkubirali 10 minut v temi. Po odstranitvi srebrovega nitrata smo celice še 3-krat sprali z destilirano vodo in jih pustili v vodi tretjega spiranja ter jih za 30 minut izpostavili močni svetlobi (sonce, lahko tudi UV lučka). Tako pripravljen preparat smo pregledali pod mikroskopom in fotografirali. Vidimo črne depozite elementarnega srebra.

3.2.10 Analiza s pretočno citometrijo

Z metodo pretočne citometrije smo preverjali učinkovitost in čistost populacije celic po ločevanju z imunomagnetskim ločevanjem ter določali istovetnost dveh populacij MMC med gojenjem v dveh različnih gojiščih (MSCGM in NHEM Plus). Uporabili smo pretočni citometer FACSCalibur™ Becton Dickinson (**Slika 6**).

Pri označevanju celic smo težili k temu, da smo vzorceobarvali z enakimi koncentracijami protiteles med različnimi celičnimi označevalci in med pripadajočimi izotipskimi kontrolami. Izotipska kontrola nam omogoča preverjanje nespecifičnih vezav protiteles na celice. To so protitelesa enakega razreda kot protitelesa s katerim označujemo celične označevalce, vendar ne prepoznavajo humanih antigenov. Podatek, dobljen za izotipske kontrole, upoštevamo tako, da odštejemo vrednost od vrednosti pridobljene pri protitelesu, s katerim smo označili celične označevalce. Po potrebi smo korigirali koncentracije protiteles z dodajanjem ustrezne volumenje DPBS ter s tem izenačili koncentracije protiteles.

3.2.10.1 Preverjanje učinkovitosti in čistosti populacije celic po imunomagnetnem ločevanju

Za ocenitev učinkovitosti in čistosti populacije celic po imunomagnetnem ločevanju smo potrebovali tri vzorce celic treh korakov imunomagnetnega ločevanja (glej poglavje: Imunomagnetno ločevanje). Ker so bile celice že predhodno zaradi ločevanja na celični označevalec CD271 označene s protitelesi proti CD271-PE smo za ta poskus vzorčili suspenzijo MNC pred označevanjem (s tem smo celice označili z ustreznimi izotipskimi kontrolami, da smo preverjali nespecifične vezave protiteles na celice) in pred nanosom na kolono (s tem smo dobili podatek, kolikšen je delež CD271 pozitivnih celic, ki se nahaja v osnovni suspenziji) in suspenzijo CD271 pozitivnih celic po končanem imunomagnetnem ločevanju (s tem smo dobili podatek kolikšen delež CD271 pozitivnih celic je prisotnih po selekciji oz. koliko CD271 negativnih celic smo se znebili). Za označevanje celic smo uporabili protitelo za pretočno citometrijo proti CD45 in ustrezne izotipske kontrole (**Preglednica 12**).

V epruvetah za pretočno citometrijo smo vzorce pripravili tako, da število celic v $50 \mu\text{l}$ pufra za spiranje ni presegalo 5×10^6 celic. Nato smo celicam dodali ustrezni volumen protiteles (**Preglednica 12**) za posamezen vzorec celic, ki smo jih uporabili za $70 \mu\text{l}$ mešanice.

Tako pripravljeni vzorce smo inkubirali 30 minut v temi na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vsaki epruveti dodali 3 ml DPBS in centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$ na sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo povsem odstranili supernatant in pelet resuspendirali v nekaj kapljicah DPBS. Pazili smo, da smo imeli homogeno suspenzijo celic. Tako pripravljeni vzorce smo analizirali na pretočnem citometru FACSCaliburTM Becton Dickinson (**Slika 6**). Za merjenje FSC in SSC ter detekcijo fluorokromov FITC in PE smo uporabili laser z valovno dolžino 488 nm. Dobljene podatke smo analizirali z računalniškim programom Cell Quest 3.0.1 in Cell Quest Pro 6.0.

Preglednica 12: Sestava $70 \mu\text{l}$ mešanic za določanje učinkovitosti in čistosti populacije celic po imunomagnetnem ločevanju.

vzorec	Suspenzija MNC pred označevanjem – Izotipska kontrola	
protitelo	mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ izotipska kontrola, označeno s FITC (konc. $50 \mu\text{g/ml}$)	mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ izotipska kontrola, označeno s PE (konc. $25 \mu\text{g/ml}$)
$V_{\text{protitelesa}}$	$1,25 \mu\text{l}$	$2,5 \mu\text{l}$
V_{DPBS}	$16,25 \mu\text{l}$	
V_{vzorca}		$50 \mu\text{l}$
$V_{\text{končni}}$		$70 \mu\text{l}$
vzorec	Suspenzija MNC pred nanosom na kolono	
protitelo	mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ proti humanemu CD45, označeno s FITC (konc. $6,25 \mu\text{g/ml}$)	
$V_{\text{protitelesa}}$	$10 \mu\text{l}$	
V_{DPBS}	/	
V_{vzorca}	$50 \mu\text{l}$	
$V_{\text{končni}}$	$70 \mu\text{l}$	

vzorec	Suspenzija CD271 pozitivnih celic
protitelo	mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ proti humanemu CD45, označeno s FITC (konc. 6,25 µg/ml)
V _{protitelesa}	10 µl
V _{DPBS}	/
V _{vzorca}	50 µl
V _{končni}	70 µl

3.2.10.2 Določanje istovetnosti MMC

Poglavitnega pomena je istovetnosti MMC med gojenjem. Namreč pomembno je, da se celice med gojenjem ne spreminjajo po svojih lastnostih (morfologija, sposobnost diferenciacije). Da bi preverili istovetnosti celic med gojenjem, nam poleg sposobnosti osteodiferenciacije (glej poglavje: Osteodiferenciacija) to omogoča tudi preverjanje izražanja celičnih označevalcev na celični površini.

Vzorce pasaže 3 in 7 za vzorce KM64 in KM66 ter pasaž 3, 7, 10 in 13 za vzorec KM73 smo vzorčili med gojenjem populacij MMC pri poskusu, kjer smo primerjali rast izoliranih populacij MMC (glej poglavje: Primerjava rasti različnih populacij MMC). Za označevanje celic smo uporabili protitelo za pretočno citometrijo proti- Stro-1, CD73, CD105, CD166, CD271, CD45 in ustrezne izotipske kontrole (**Preglednica 13**).

Da smo pridobili dovolj veliko število MMC za preverjanje prisotnosti celičnih označevalcev, smo morali del celic, ki jih nismo uporabili za nadaljnje poskuse, nasaditi v gojilno posodico z površino 25 cm² v nasaditveni gostoti 5.000 celic/cm², torej 125.000 celic. Celice smo tripsinizirali in prešteli s števno komoro za enkratno uporabo FastRead 102, ko so dosegle 70 - 90% konfluenco. Po tripsinizaciji smo celice centrifugirali 5 minut pri 400 × g na sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo povsem odstranili supernatant in pelet resuspendirali v 200 µl DPBS. Nato smo prenesli 50 µl suspenzije celic v 4 epruvete za pretočno citometrijo. Tako smo v posamezni epruveti dobili okoli 5 × 10⁶ celic. Nato smo celicam dodali ustrezen volumen protiteles (**Preglednica 13**) za posamezen kombinacije celičnih označevalcev, ki smo jih uporabili za 70 µl mešanice.

Tako pripravljene vzorce smo inkubirali 30 minut v temi na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vsaki epruveti dodali 3 ml DPBS in centrifugirali 10 minut pri 300 × g na sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo povsem odstranili supernatant in pelet resuspendirali v nekaj kapljicah DPBS. Pazimo da imamo homogeno suspenzijo posameznic celic. Tako pripravljene vzorce smo analizirali na pretočnem citometru FACSCaliburTM Becton Dickinson (**Slika 6**). Za merjenje FSC in SSC ter detekcijo fluorokromov FITC in PE smo uporabili laser z valovno dolžino 488 nm. Dobljene podatke smo analizirali z računalniškim programom Cell Quest 3.0.1 in Cell Quest Pro 6.0.

Preglednica 13: Sestava 70 µL mešanic za različne kombinacije celičnih označevalcev.

vzorec	Izotipska kontrola	
protitelo	mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ izotipska kontrola, označeno s FITC (konc. 50 µg/ml)	mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ izotipska kontrola, označeno s PE (konc. 25 µg/ml)
V _{protitelesa}	1,25 µl	2,5 µl
V _{DPBS}	16,25 µl	
V _{vzorca}		50 µl
V _{končni}		70 µl
vzorec	Stro-1 in CD73	
protitelo	mišje protitelo razreda IgM proti humanemu Stro-1, označeno s FITC (konc. ni podatka)	mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ proti humanemu CD73, označeno s PE (konc. 6,25 µg/ml)
V _{protitelesa}	10 µl	10 µl
V _{DPBS}	/	
V _{vzorca}		50 µl
V _{končni}		70 µl
vzorec	CD105 in CD166	
protitelo	mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ proti humanemu CD105, označeno s FITC (konc. ni podatka)	mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ proti humanemu CD166, označeno s PE (konc. 12,5 µg/ml)
V _{protitelesa}	10 µl	5 µl
V _{DPBS}	/	5 µl
V _{vzorca}		50 µl
V _{končni}		70 µl
vzorec	CD45 in CD271	
protitelo	mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ proti humanemu CD45, označeno s FITC (konc. 6,25 µg/ml)	mišje protitelo razreda IgG ₁ proti humanemu CD271, označeno s PE (5,5 µg/ml)
V _{protitelesa}	10 µl	10 µl
V _{DPBS}	/	
V _{vzorca}		50 µl
V _{končni}		70 µl

3.2.11 Imunobarvanje

Metoda imunobarvanja (angl. *ICC, Immunocytochemistry*) temelji na imunoloških metodah proučevanja zgradbe celic in uporablja specifična protitelesa, označena s fluorokromom ali encimom, ki da obarvan reakcijski produkt. Produkt vidimo pod fluorescentnim mikroskopom. Z metodo imunobarvanja smo podobno kot s pretočno citometrijo določali istovetnost populacij MMC izoliranih z imunomagnetnim ločevanjem gojenih v gojišču NHEM Plus ter izoliranih z adherenco na plastiko gojenih v gojišču MSCGM. Edina razlika med metodama je v tem, da lahko z imunobarvanjem določimo tudi lokacijo celičnega označevalca (citoplazma, jedro ...).

Vzorce gojenih MMC iz pasaže 3 vzorca KM61 populacija ADH v gojišču MSCGM in KM62 populacija MAG v gojišču NHEM Plus smo uporabili za to metodo. Za označevanje celic smo uporabili protitelesa za imunobarvanje proti-vimentin, CD73, CD90, CD105,

CD166, CD45 in ustreznata sekundarna protitelesa ali izotipske kontrole odvisno od tega ali je bilo protitelo označeno ali ne. S to metodo smo pobarvali vse kombinacije populacij in gojišč v pasažah 3 in 7, ki smo jih uporabili za določanje istovetnosti MMC s pretočno citometrijo. Neoznačena protitelesa postanejo vidna z uporabo označenih ustreznih sekundarnih protiteles. S kontrolo preverjamo morebitne nespecifične vezave ustreznega označenega sekundarnega protitelesa. Da to preverimo, nanesemo ustrezzo označeno sekundarno protitelo na s protitelesi označene in neoznačene celice. Označeno protitelo ne potrebuje označenega sekundarnega protitelesa. Tukaj smo enako kot pri pretočni citometriji za preverjanje nespecifične vezave protitelesa uporabili ustrezzo izotipsko kontrolo, ki smo jo enako kot protitelo nanesli na neoznačene celice. Obarvanje za celični označevalc vimentin nam predstavlja pozitiven rezultat barvanja, barvanje za celični označevalc CD45 pa negativen rezultat. Če sta ta celična označevalca obarvana po pričakovanjih, pomeni, da smo barvanje izvedli pravilno.

Predhodno smo si pripravili dve gojilni posodici s 24 luknjicami za vsako populacijo MMC. Za vsa protitelesa in ustrezone kontrole ter izotipske kontrole smo potrebovali 11 luknjic. V te luknjice smo dali sterilizirana okrogla krovna stekelca in jih prekrili z 0,5 ml 0,1% želatine ter inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Želatina nam omogoči pritrdirtev celic na stekelca. Po inkubaciji smo odstranili želatino in v vsako luknjico dali 0,5 ml pripravljene suspenzije MMC. Celice v pasaži 3 smo tripsinizirali in prešteli s števno komoro za enkratno uporabo FastRead 102, ko so dosegle 70 - 90% konfluenco. Po tripsinizaciji smo celice centrifugirali 5 minut pri $400 \times g$ na sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo povsem odstranili supernatant in pelet resuspendirali 1 ml DPBS. Odvzeli smo ustrezen volumen suspenzije z 110.000 celicami. S tem številom smo zagotovili nasaditveno gostoto 5.000 celic/cm² oz. 10.000 celic na luknjico s površino 2 cm². Ta volumen smo dali v 5,5 ml ogretega ustreznega svežega gojišča, v katerem smo predhodno gojili celice.

Celice smo v gojilni posodici gojili do 70 - 90% konfluence. Pred imunobarvanjem smo odstranili gojišče ter celice 1-krat sprali z DPBS. Celice smo nato 15 minut fiksirali. Iz preteklih izkušenj smo za vse celične označevalce uporabili fiksirno sredstvo Accustain, razen za CD90. Zanj smo uporabili 3,7% formaldehid. Celice smo nato 3-krat sprali z DPBS ter jih permeabilizirali z dodatkom 0,1% Tritona in inkubirali 15 minut. Celice smo 1-krat sprali z DPBS. Sledila je 30 minutna blokada s 250 µl 10% kozjega seruma. Za tem smo dodali 250 µl ustrezzo redčenih protiteles (označenih protiteles in neoznačenih protiteles) (**Preglednica 14**). V luknjice, ki so služile za kontrole neoznačenim protitelesom in izotipske kontrole označenim, smo dali enako količino DPBS. To smo inkubirali 1 h v temi na sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo odstranili raztopino s protitelesi in celice 3-krat sprali z DPBS. Nato smo dodali 250 µl ustreznih sekundarnih protiteles in izotipskih kontrol (**Preglednica 14**) in inkubirali 1 h v temi na sobni temperaturi. Zopet smo odstranili raztopino s protitelesi in 3-krat sprali s DPBS. Pri zadnjem spiranju smo celicam za 1-2 minuti dodali raztopino DAPI, ki obarva jedra modro, in še enkrat sprali s DPBS. Okrogla krovna stekelca z obarvanimi celicami smo vzeli iz luknjic in pripravili preparate za mikroskopiranje. Stekelce smo položili v kapljico glicerola in ga prekrili s krovnim stekлом. Robove smo zamazali s prozornim lakom za nohte ter s tem preprečili izhlapevanje tekočine iz preparata. Preparate smo slikali s

fluorescentnim mikroskopom. Dobljene slike smo obdelali z računalniško opremo AxioVision Release 4.7.2. in MacBiophotonics ImageJ.

Preglednica 14: Označena in neoznačena protitelesa in njihove ustrezné negativne kontrole.

protitelo	redčitev	sekundarno protitelo	redčitev	negativna kontrola
Mišje protitelo razreda IgG ₁ , proti humanemu CD90	1:250	Kozje protitelo proti mišjemu IgG ₁ , označeno s FITC	1:500	DPBS + sekundarno protitelo
Mišje protitelo razreda IgG ₁ , proti humanemu CD105	1:250			
Mišje protitelo razreda IgM, proti humanemu vimentin	1:250	Kozje protitelo proti mišjemu IBM, označeno s Tx	1:500	
protitelo	redčitev	izotipska kontrola	redčitev	negativna kontrola
Mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ proti humanemu CD73, označeno s PE	1:50	Mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ izotipska kontrola, označeno s PE	1:50	izotipska kontrola
Mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ proti humanemu CD166, označeno s PE	1:50			
Mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ proti humanemu CD45, označeno s FITC	1:50	Mišje protitelo razreda IgG ₁ , κ izotipska kontrola, označeno s FITC	1:50	

3.2.12 Statistika

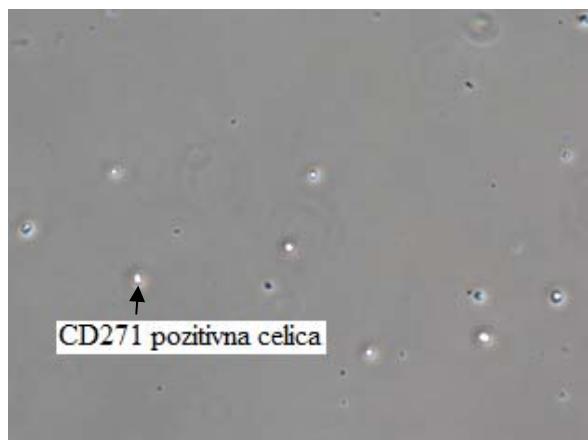
Uporabljali smo osnovne parametrične metode statistične obdelave podatkov, in sicer povprečje in standardni odklon. Za to smo uporabili programsko opremo Microsoft Office Excel 2007.

4 REZULTATI

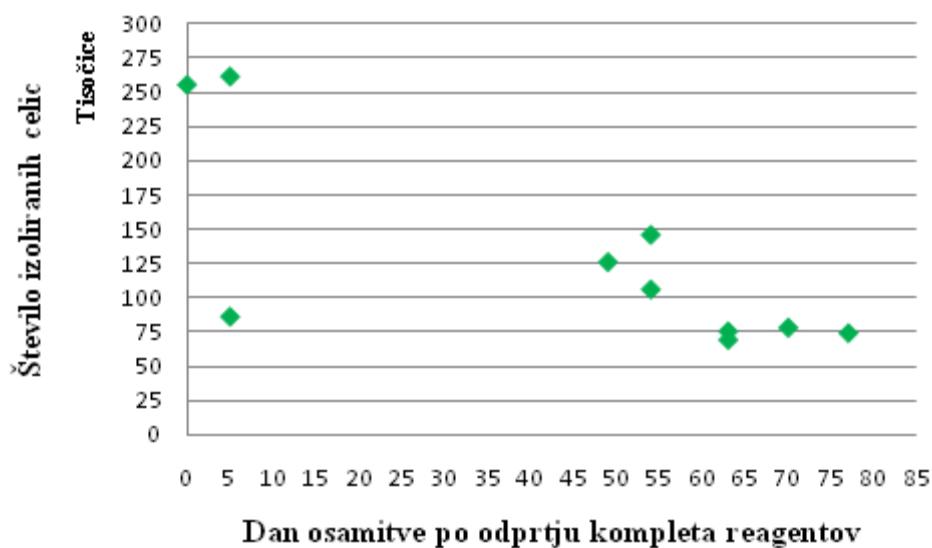
4.1 OSAMITEV ENOJEDRNIH CELIC

Za osamitev MNC smo uporabili gradientno centrifugiranje z uporabo pripravka Lymphlyte-H. To smo izvedli na več različnih vzorcih KM in njihovo število prešteli z napravo Vi-Cell XR. Iz vzorcev KM smo osamili med $3,1 \times 10^7$ in $54,5 \times 10^7$ MNC/ml. Njihova viabilnost je bila med 86,4 in 98,9%.

4.2 PRIMERJAVA METOD OSAMITVE



Slika 11: CD271 pozitivne celice, ki smo jih osamili s kompletom reagentov CD271 MicroBead (fazni kontrast, 100-kratna povečava).



Slika 12: Število celic po osamitvi z imunomagnetskim ločevanjem v odvisnosti od dneva osamitve po odprtju kompleta reagentov. Točke predstavljajo število celic, ki smo jih osamili z imunomagnetskim ločevanjem za posamezen vzorec KM.

Z imunomagnetskim ločevanjem smo po osamitvi pridobili med 69.000 in 262.000 celic, ki smo jih gojili naprej za primerjavo metod osamitve (**Preglednica 15**). Iz dobljenega števila

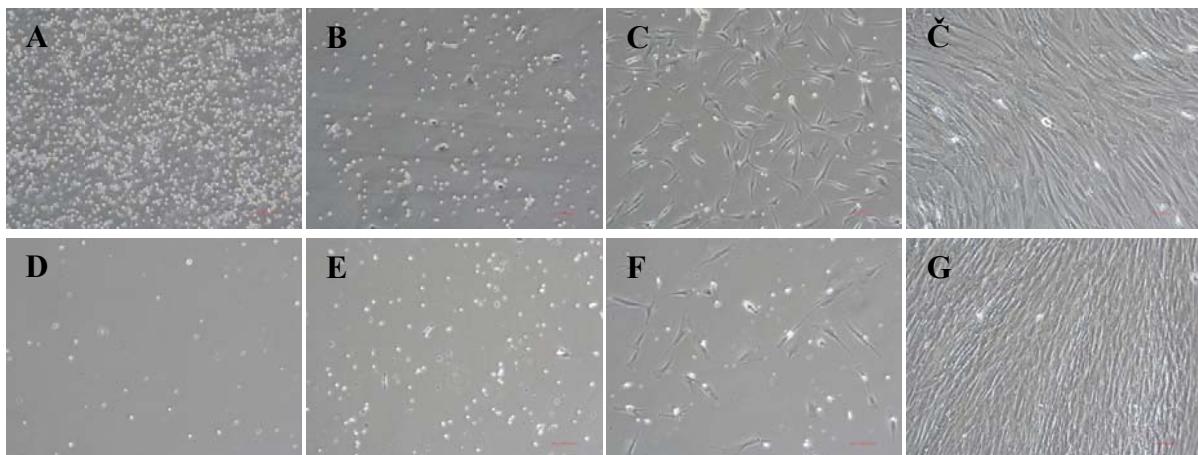
izoliranih celic, preštetih po osamitvi, smo ugotovili, da se učinkovitost kompleta reagentov skupaj z daljšim časom po njegovem odprtju zmanjšuje, zato ima število celic, ki smo jih osamili, padajoč trend (**Slika 12**).

Za vsako metodo osamitve smo, tako z imunomagnetskim ločevanjem in adherenco na plastiko, iz suspenzije MNC istega KM vzeli po 3×10^7 MNC. S tem številom smo zagotovili zadostno število celic po osamitvi za nadaljnjo gojenje, potrebno za primerjavo metod.

Preglednica 15: Primerjava izplena celic, ki smo jih osamili, med imunomagnetskim ločevanjem (MAG) in klasično osamitvijo z adherenco na plastiko (ADH) iz istega začetnega števila celic MNC.

Vzorec	način osamitve	začetno št. celic	št. celic po osamitvi	št. celic po 14-dnevnom gojenju v ustreznu gojišču
KM64	ADH	3×10^7	/	384.000
	MAG		256.000	148.000
KM65	ADH	3×10^7	/	368.000
	MAG		86.000	0
KM66	ADH	3×10^7	/	574.000
	MAG		262.000	146.000
KM68	ADH	3×10^7	/	298.000
	MAG		106.000	24.000
KM69	ADH	3×10^7	/	366.000
	MAG		146.000	31.000
KM72	ADH	3×10^7	/	204.000
	MAG		69.000	85.500
KM73	ADH	3×10^7	/	452.000
	MAG		75.300	168.500
KM76	ADH	3×10^7	/	214.000
	MAG		78.000	4.000
KM77	ADH	3×10^7	/	178.000
	MAG		74.000	0
/-ni podatka		povp. št. celic po 14-dnevnom gojenju	ADH	337.556 ± 128.949
			MAG	86.714 ± 68.117

Celice, ki smo jih osamili z opisanima metodama, smo gojili 14 dni, da smo metodi lahko primerjali. Po 14 dneh gojenja smo pridobili populacijo MAG iz celice, ki smo jih osamili z imunomagnetskim ločevanjem in gojenih v gojišču NHEM. Njihovo število je bilo med 4.000 in 168.500 celic, pri dveh vzorcih se celice niso pomnožile. Populacijo ADH smo dobili z odstranitvijo neadherentnih celic po 48 h gojenje in adherentne gojili v isti posodi naprej v gojišču MSCGM. Njihovo število je bilo med 178.000 in 574.000 celic. Primerjavo osamitev pa smo naredili na več različnih bioloških ponovitvah oz. vzorcih KM. Povprečno število populacije MAG je bilo 86.714 ± 68.117 celic, brez upoštevanja vzorcev, kjer celice niso zrasle. Povprečno število populacije ADH pa je bilo 337.556 ± 128.949 celic (**Preglednica 15**).



Slika 13: Morfologija MMC in njihova rast v enoslojni kulturi. Prikaz vzorca KM72 za populacijo ADH (A-Č) in MAG (D-G) za dan 0 (A,D) (dan nasaditve), 2 (B,E) (dan, kot odstranimo neadherentne celice), 7 (C,F) (dan, ko prvič zamenjamo gojišče) in 14 (Č,G) (dan, ko celice tripsiniziramo in prestejemo dobitek celic po vsaki metodi) (fazni kontrast, 100-kratna povečava).

4.3 PRIMERJAVA RASTI RAZLIČNIH POPULACIJ MMC

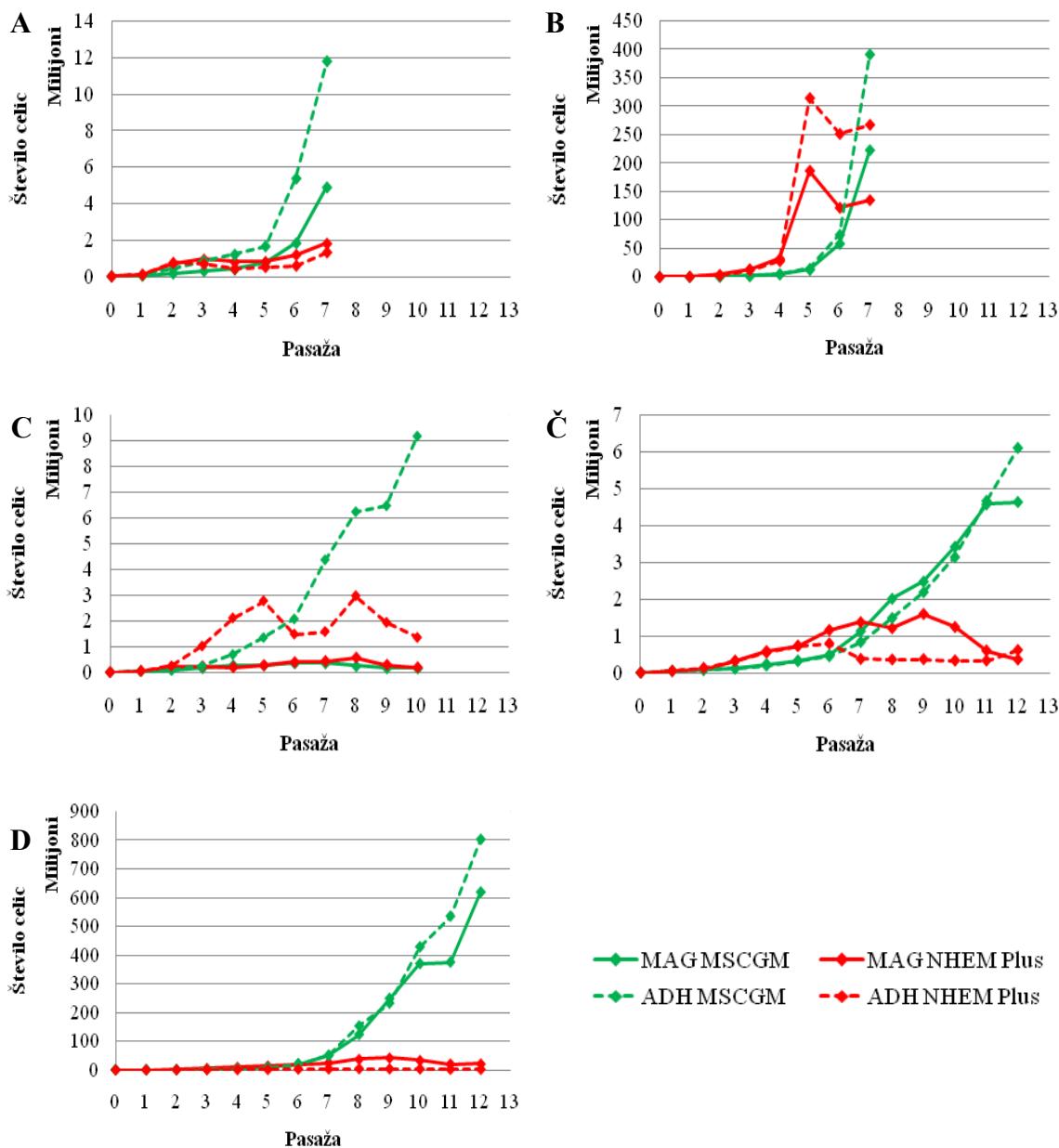
Pri tem poskusu je bil naš namen poiskati najprimernejšo kombinacijo metode osamitve in gojišča. Tu smo kombinirali izolirane populacije ADH in MAG z dvema gojiščema (MSCGM in NHEM Plus).

Za primerjavo rasti izoliranih populacij smo uporabili rastne krivulje.

Populaciji ADH in MAG pridobljene po 14 dnevnom gojenju smo razdelili na dva dela. En del populacije smo uporabili za gojenje v gojišču MSCGM. Drugi del za gojenje v gojišču NHEM Plus. Da smo lahko primerjali vse štiri kombinacije med seboj, je morala biti nasaditvena gostota v tekoči pasaži enaka med vsemi kombinacijami. Teoretični prirast števila celic na posamezno pasažo smo izračunali po formuli (2) in izrisali grafe.

Dva vzorca kostnega mozga KM64 in KM66 smo gojili do pasaže 7 (**Slika 14A in 14B**). Pri obeh se je izkazala za najboljšo možnost kombinacija populacije ADH in gojišča MSCGM. Ker krivulje pri vzorcih KM64 in KM66 niso dosegle platoja pri pasaži 7, nas je zanimalo, ali se celice enako obnašajo tudi v kasnejših pasažah. Za ta namen smo en vzorec kostnega mozga KM68 gojili do pasaže 10 (**Slika 14C**). Tudi tukaj je prevladovala kombinacija populacije ADH in gojišča MSCGM. Opazili smo, da se začne število celic v gojišču NHEM Plus zmanjševati po pasaži 8 (**Slika 14C**). Edino pri vzorcu KM68 smo imeli primer, da je bila boljša populacija ADH ne glede na gojišče. Da bi razrešili, ali je to zgolj izjema, in ugotovili ali se v kasnejših pasažah krivulji v gojišču MSCGM obrneta navzdol, smo potrebovali dva vzorca kostnega mozga KM69 in KM73. Pri obeh vzorcih kostnega mozga KM69 in KM73 (**Slika 14Č in 14D**) smo ugotovili, da je bila kombinacija populacije MAG in gojišča MSCGM vzorca KM68 izjemoma podobna rastnim krivuljam v gojišču NHEM Plus. Zopet se začne zmanjševati število celic pri pasaži 9 za celice gojene v gojišču NHEM Plus. Celicam gojenim v gojišču MSCGM pa se število ni zmanjšalo do pasaže 12. Pri tej pasazi smo zaključili z gojenjem, ker so celice v gojišču NHEM Plus zelo slabo rasle in primerjava ne bi bila več mogoča.

Najboljša možnost je kombinacija populacije ADH in gojišča MSCGM, sledi kombinacija populacije MAG v enakem gojišču.

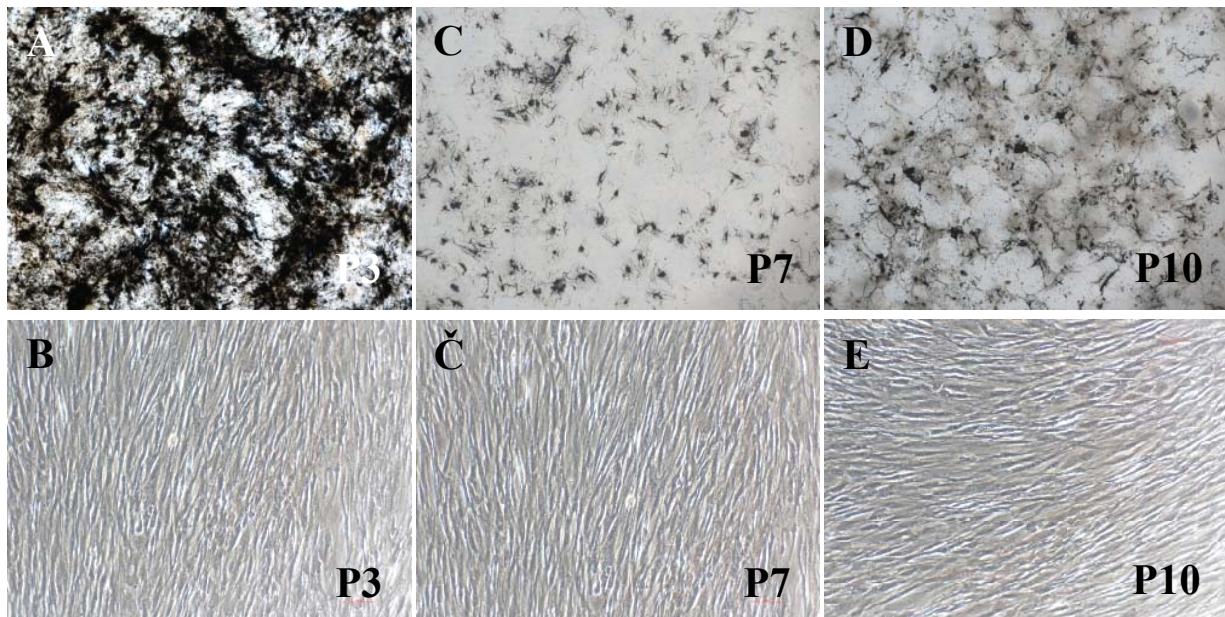


Slika 14: Primerjava rasti populacij celic, ki smo jih osamili z imunomagnetskim ločevanjem (MAG) in z adherenco na plastiko (ADH) v kombinaciji z gojiščem MSCGM in NHEM Plus za A: KM64, B: KM66, C: KM68, Č: KM 69 in D: KM73.

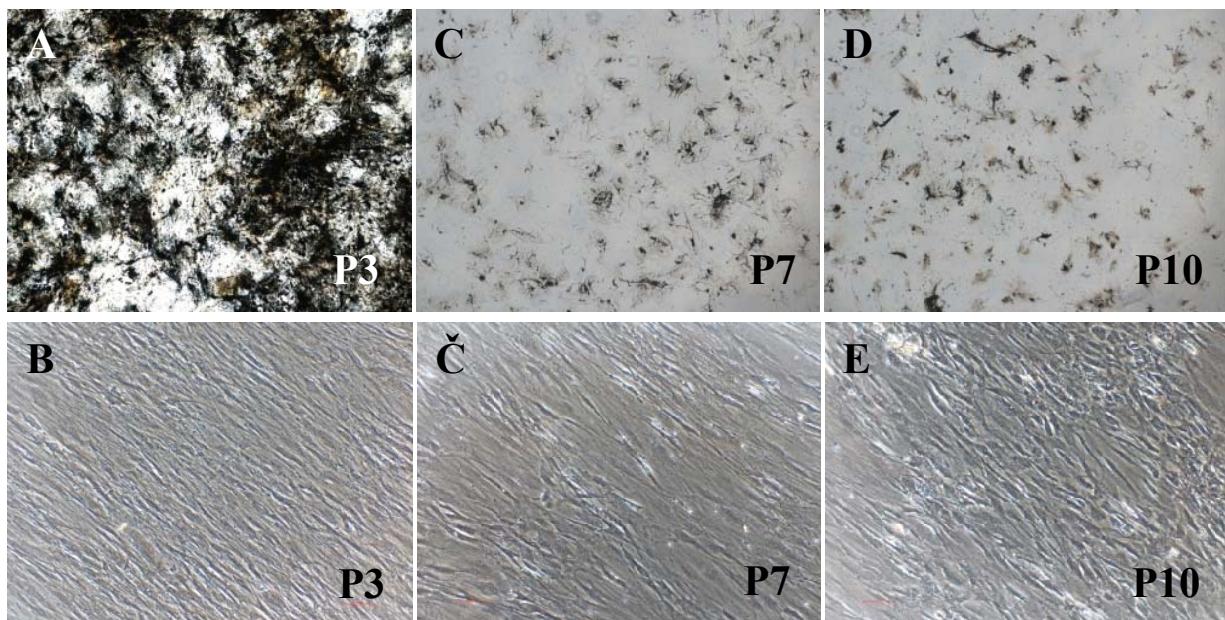
4.4 OSTEODIFERENCIACIJA

Osteodiferenciacijo smo preverjali pri vzorcih KM72, katerega rezultati so prikazani v nadaljevanju (**Slike 15-18**) in KM73 med gojenjem celic. Preverjali smo jo v pasažah 3, 7, 10 za KM72 in 3, 7, 11 in 14 za KM73 za vsako kombinacijo izolirane populacije ADH in MAG ter gojišča MSCGM in NHEM Plus. Za osteodiferenciacijo smo uporabili celice, ki jih nismo porabili za nadaljnjo nasajevanje pri poskusu rastnih krivulj.

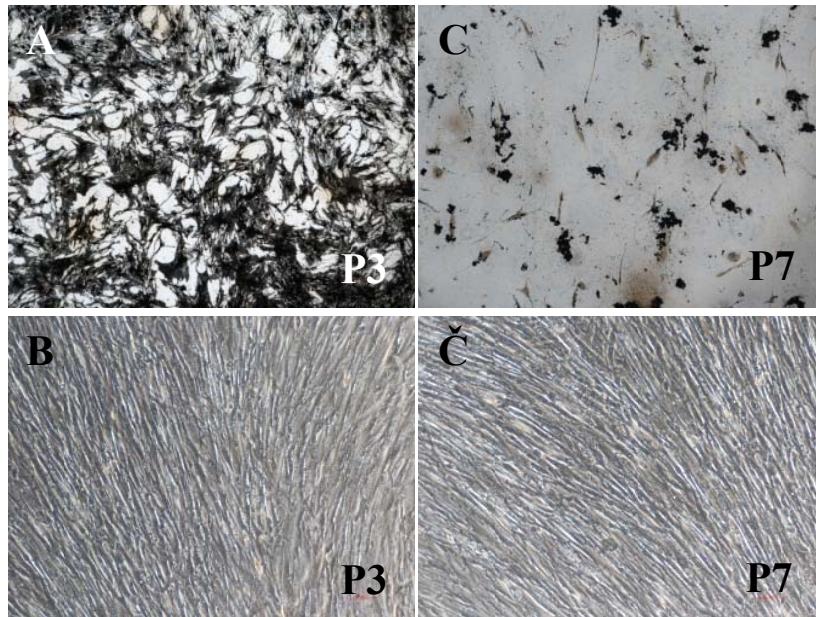
Celice smo gojili 21 dni v gojišču, ki podpira osteogeno diferenciacijo. Paralelno smo gojili tudi v ustreznem kontrolnem gojišču. Po 21 dneh smo izvedli barvanje von Kossa.



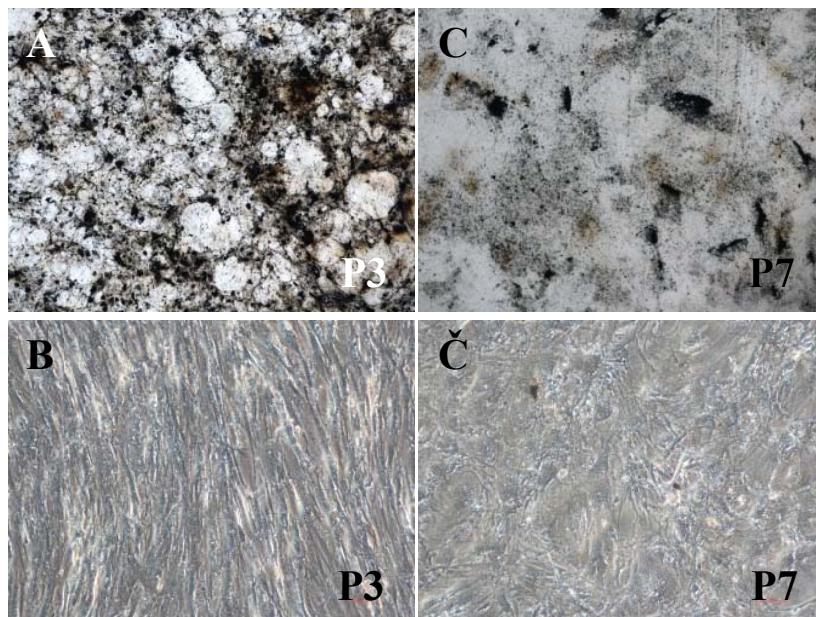
Slika 15: Slike uspešnosti osteodiferenciacije s pripadajočimi kontrolami za kombinacijo populacije ADH v gojišču MSCGM za vzorec KM72 po izvedbi barvanja von Kossa. A: pozitivno obarvanje celic v pasaži 3, B: negativna kontrola celic v pasaži 3, C: pozitivno obarvanje celic v pasaži 7, Č: negativna kontrola celic v pasaži 7, D: pozitivno obarvanje celic v pasaži 10 in E: negativna kontrola celic v pasaži 10 (fazni kontrast, 100-kratna povečava).



Slika 16: Slike uspešnosti osteodiferenciacije s pripadajočimi kontrolami za kombinacijo populacije MAG v gojišču MSCGM za vzorec KM72 po izvedbi barvanja von Kossa. A: pozitivno obarvanje celic v pasaži 3, B: negativna kontrola celic v pasaži 3, C: pozitivno obarvanje celic v pasaži 7, Č: negativna kontrola celic v pasaži 7, D: pozitivno obarvanje celic v pasaži 10 in E: negativna kontrola celic v pasaži 10 (fazni kontrast, 100-kratna povečava).



Slika 17: Slike uspešnosti osteodiferenciacije s pripadajočimi kontrolami za kombinacijo populacije ADH v gojišču NHEM Plus za vzorec KM72 po izvedbi barvanja von Kossa. A: pozitivno obarvanje celic v pasaži 3, B: negativna kontrola celic v pasaži 3, C: pozitivno obarvanje celic v pasaži 7 in Č: negativna kontrola celic v pasaži 7 (fazni kontrast, 100-kratna povečava).



Slika 18: Slike uspešnosti osteodiferenciacije s pripadajočimi kontrolami za kombinacijo populacije MAG v gojišču NHEM Plus za vzorec KM72 po izvedbi barvanja von Kossa. A: pozitivno obarvanje celic v pasaži 3, B: negativna kontrola celic v pasaži 3, C: pozitivno obarvanje celic v pasaži 7 in Č: negativna kontrola celic v pasaži 7 (fazni kontrast, 100-kratna povečava).

Preglednica 16: Primerjava uspešnosti osteodiferenciacije med pasažami (P) 3, 7, 10 oz. 11 in 14 za KM72 in KM73.

vzorec	kombinacija	P3		P7		P10/P11		P14	
		kont.	vz.	kont.	vz.	kont.	vz.	kont.	vz.
KM72	ADH MSCGM	-	+++	-	++	-	++	/	/
	MAG MSCGM	-	+++	-	++	-	++	/	/
	ADH NHEM Plus	-	+++	-	++	/	/	/	/
	MAG NHEM Plus	-	+++	+	++	/	/	/	/
KM73	ADH MSCGM	-	+++	-	++	-	+	-	+
	MAG MSCGM	-	+++	-	++	-	+	-	+
	ADH NHEM Plus	-	+++	-	++	/	/	/	/
	MAG NHEM Plus	-	+++	?	++	/	/	/	/

/ ni podatka + delno diferencirano

- ni diferencirano ++ diferencirano

+++ dobro diferencirano

Podatkov za gojišče NHEM Plus za pasaže 10/11 in 14 nimamo, ker so se celice slabo delile in ni zraslo dovolj celic za ta test. Pri tem poskusu smo dobili pričakovane rezultate. Z večanjem pasaž so celice izgubljajo sposobnost diferenciacije. Pri kontroli smo opazili, da so celice pri pasaži 7 kombinacije populacije MAG in gojišča NHEM Plus spremenile morfologijo v primerjavami z ostalimi kontrolami (označeno z ?).

4.5 ANALIZA S PRETOČNO CITOMETRIJO

4.5.1 Preverjanje učinkovitosti in čistosti populacije celic po imunomagnetskem ločevanju

S pretočno citometrijo smo z uporabo ustreznih mišjih protiteles proti humanim celičnim označevalcem in ustreznim izotipskim kontrolama določili prisotnost CD271 pozitivnih celic. Izotipske kontrole so protitelesa enakega razreda kot protitelesa za celične označevalce, vendar zanj niso specifične. Zato smo rezultate izotipskih kontrol odsteli od rezultatov deleža celičnih označevalcev ter se s tem znebili nespecifičnih vezav. Prisotnost smo določili v suspenziji MNC pred nanosom na kolono (delež CD271 pozitivnih celic v KM) in suspenziji CD271 pozitivnih celic (čistost CD271 pozitivne populacije celic) po imunomagnetskem ločevanju (**Preglednica 13**).

Za en vzorec kostnega mozga (KM77) pa smo izmerili tudi prisotnost v negativni frakciji, ki naj ne bi vsebovala CD271 pozitivnih celic, rezultat je znašal 0,17%. Delež je visok, ker je bil komplet reagentov pri tem vzorcu odprt že 77 dni (ni več primeren za osamitev) (**Preglednica 13**).

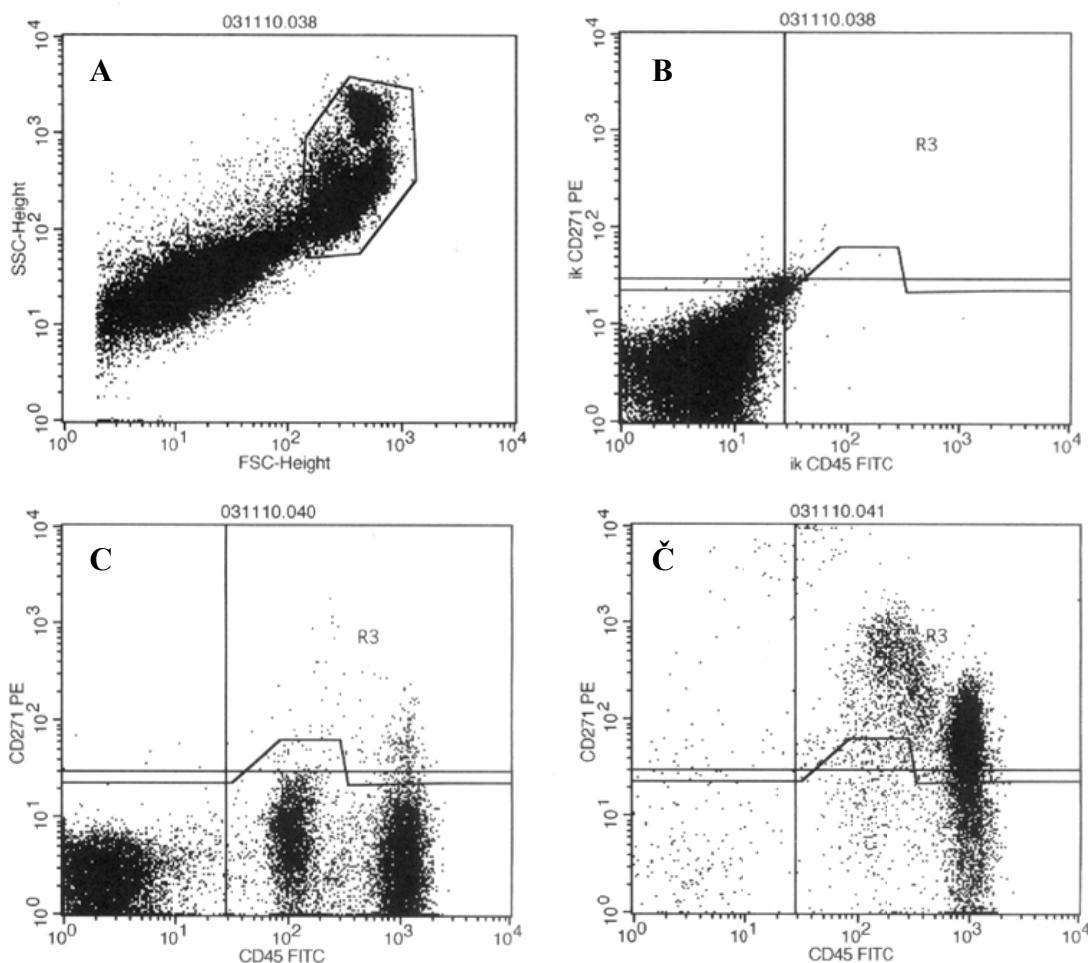
Iz točkovnih diagramov smo določili iskano populacijo celic (**Slika 19A**), vrednost izotipke kontrole (**Slika 19B**), delež CD271 pozitivnih celic v KM (**Slika 19C**) in čistost populacije CD271 pozitivnih celic (**Slika 19Č**). Ugotovili smo, da se v suspenziji MNC celic iz KM nahaja med 0,22% in 1,80% celic, torej v povprečju $0,92\% \pm 0,77\%$

(Preglednica 13). Z imunomagnetnim ločevanjem smo pridobili čistost pozitivne frakcije med 29,69% in 72,96% CD271 pozitivnih celic, torej v povprečju $50,89\% \pm 16,09\%$ (Preglednica 17).

Preglednica 17: Izkoristek imunomagnetnega ločevanja in delež CD271 pozitivnih celic oziroma čistost frakcij med imunomagnetnim ločevanjem iz enakega začetnega števila celic MNC s pretočno citometrijo na celični označevalci CD271. Legenda: ZAČ - pred imunomagnetnim ločevanjem, POZ - po imunomagnetnem ločevanju in NEG – ostanek.

		povp. delež CD271 pozitivnih celic (%)					
		KM67	KM68	KM69	KM72	KM77	
delež CD271 pozitivnih celic (%)	ZAČ	1,80	0,52	1,70	0,34	0,22	$0,92 \pm 0,77$
	POZ	72,96	42,64	53,22	55,95	29,69	$50,89 \pm 16,09$
	NEG	/	/	/	/	0,17	Povprečni izkoristek (%)
Izkoristek osamitve		17,02	28,97	15,24	37,85	33,29	$26,47 \pm 8,92$

/ ni podatka

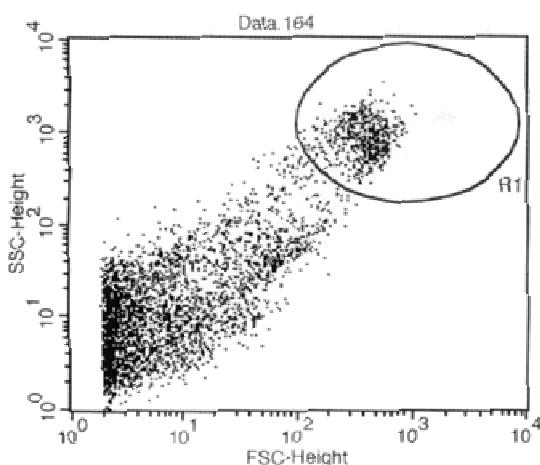


Slika 19: Primer točkovnih diagramov karakterizacije MMC s pretočno citometrijo za KM67. A: določitev iskane populacije glede na velikost in zrnatost celic po osamitvi, B: izotipska kontrola, C: delež CD271 pozitivnih celic v MNC in Č: čistost CD271 pozitivne populacije.

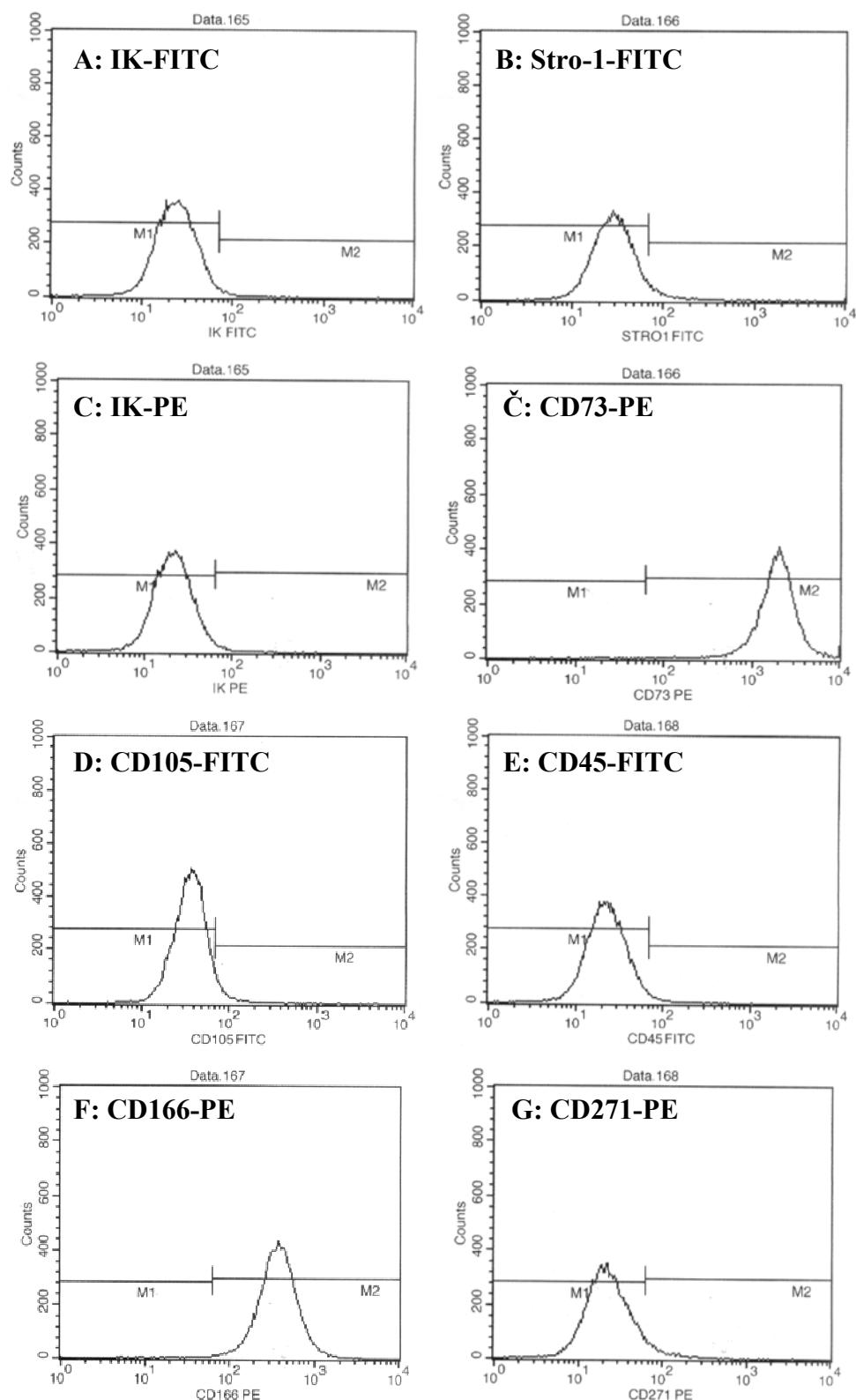
4.5.2 Določanje istovetnosti MMC s celičnimi označevalci

Med gojenjem celic smo s pretočno citometrijo z uporabo ustreznih mišjih protiteles proti humanim celičnim označevalcem in proti ustreznima izotipskima kontrolama (glej poglavje: Preverjanje učinkovitosti in čistosti populacije celic po imunomagnetnem ločevanju) določili prisotnost celičnih označevalcev Stro-1, CD73, CD105, CD166, kot negativno kontrolo pa smo uporabili CD45. Poleg tega nas je zanimalo, kaj se dogaja s celičnim označevalcem CD271 (**Preglednica 12**).

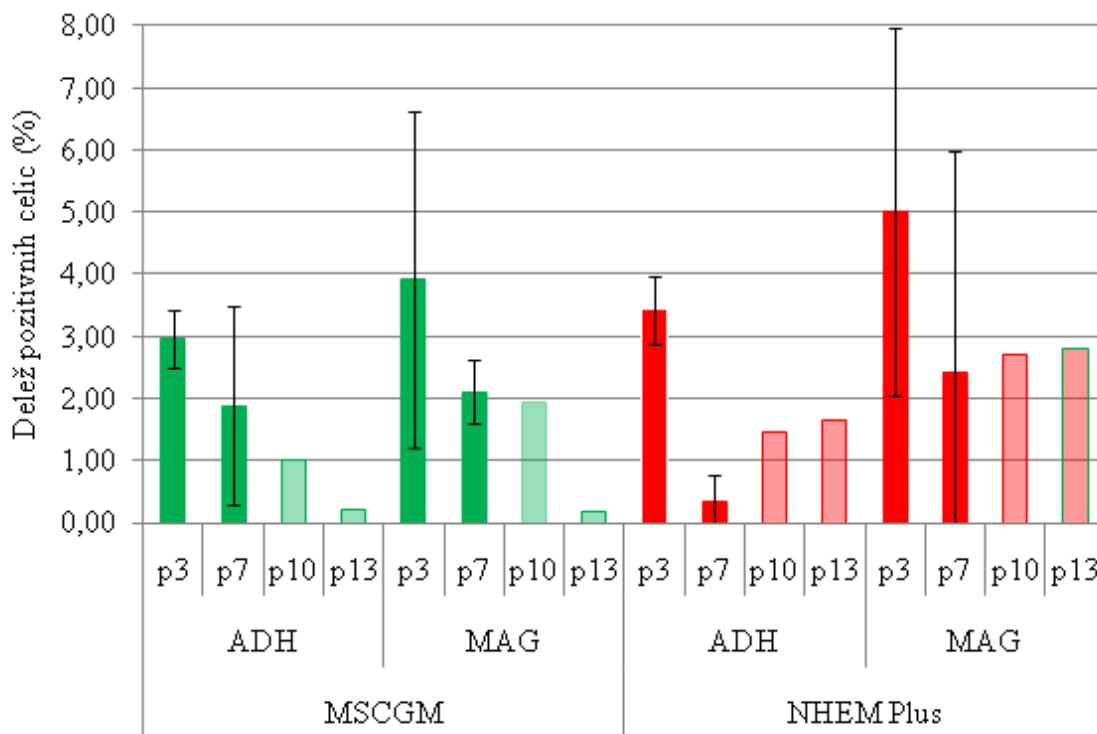
S pretočno citometrijo smo med gojenjem spremljali istovetnost MMC z izražanjem celičnih označevalcev v pasažah 3 in 7, kjer je bilo mogoče smo pogledali še pasažo 10 in 13 (na grafih označeno z bolj prosojno barvo). Pri vseh celičnih označevalcih smo iz točkovnih grafov določili iskano populacijo celic (**Slika 20**) in na histogramih (**Slike 21A-G**) določili prisotnost prej omenjenih celičnih označevalcev z upoštevanjem izotipske kontrole.



Slika 20: Primer točkovnega diagrama karakterizacije MMC s pretočno citometrijo za vzorec KM 64. Iskano populacijo smo določili glede na velikost in zrnatost gojenih celic. Uporabljena kombinacija je bila populacija ADH in gojišča MSCGM v pasaži 7. Legenda: SSC - stransko sipanje svetlobe in FSC - prednje sipanje svetlobe.

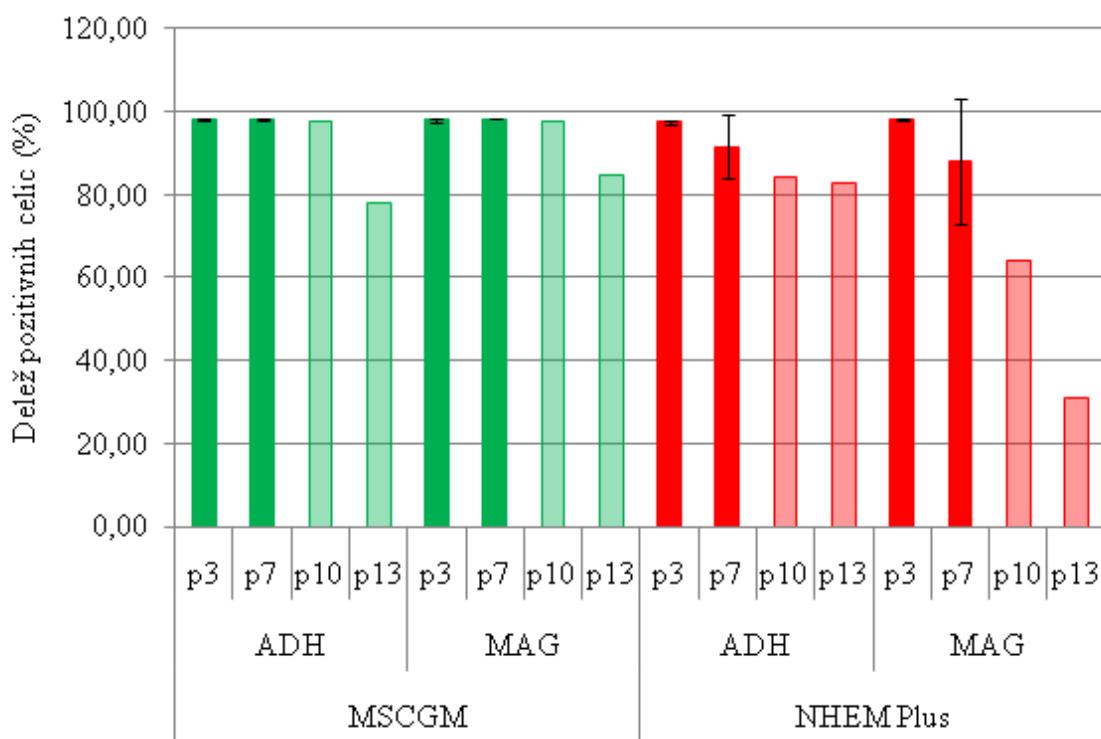


Slika 21: Primeri histogramov za karakterizacijo MMC s pretočno citometrijo za vzorec KM 66.
Uporabljena kombinacija je bila populacija ADH in gojišča MSCGM v pasaži 7. Na A: FITC in B: PE sta prikazani izotipski kontroli ter celični označevalci na: B: Stro-1, Č: CD73, D: CD105, E: CD45, F: CD166 in G: CD271. Legenda: IK: izotipska kontrola, FITC: fluorescin izotiacianat in PE: R-fikoeritrin.



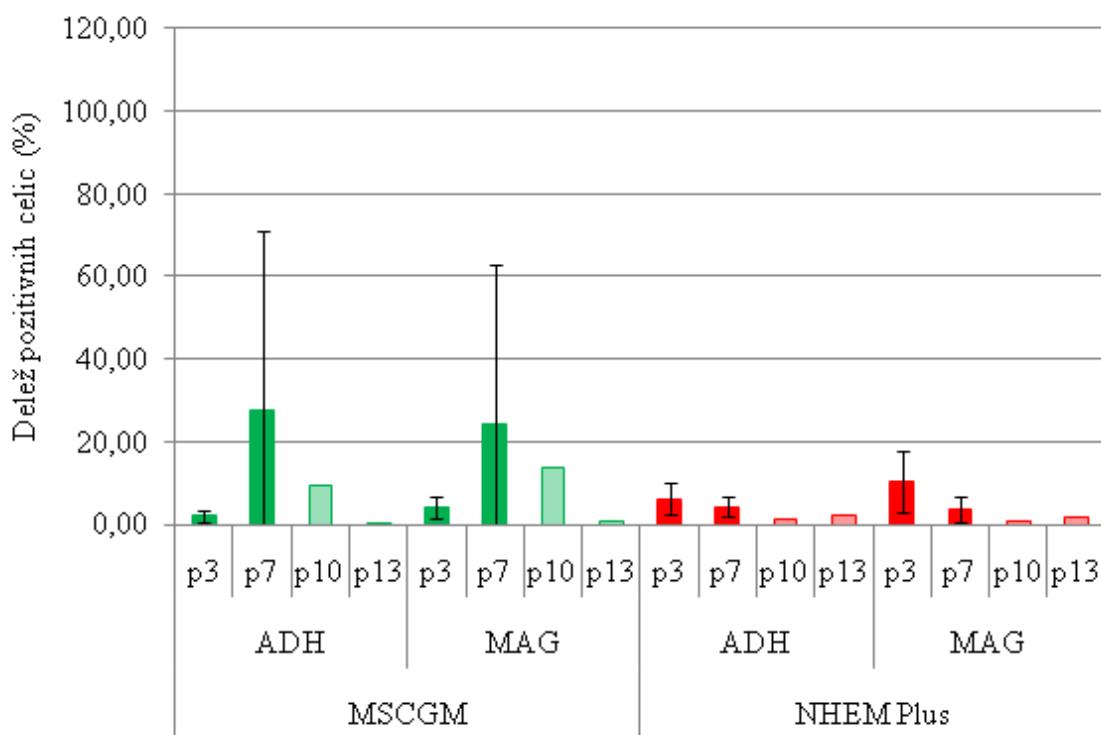
Slika 22: Vpliv gojenja na izražanje celičnega označevalca Stro-1. Na grafih so prikazani s pretočno citometrijo pridobljeni povprečni deleži celic pozitivnih za celični označevalci Stro-1 v p3 in p7, za p10 in p13 pa je prikazan rezultat vzorca KM73 (uporabljeni rezultati vzorcev KM64, KM66 in KM73). Legenda: p: pasaža, ADH: populacija izolirana z adherenco na plastiko, MAG: populacija izolirana z imunomagnetnim ločevanjem, MSCGM: gojišče namenjeno gojenju MMC podjetja Lonza, NHEM Plus: gojišče namenjeno gojenju MMC podjetja Miltenyi Biotec.

Analiza na pretočnem citometru je pokazala, da je v vseh analiziranih vzorcih v povprečju majhen delež Stro-1 pozitivnih celic, ki niha ne glede na pasažo in gojišče (Slika 22). Če primerjamo vse vzorce v pasažah 3 in 7, je v gojišču MSCGM v povprečju med $1,88\% \pm 1,59\%$ in $3,91\% \pm 2,70\%$ Stro-1 pozitivnih celic. V gojišču NHEM Plus pa je v povprečju med $0,32\% \pm 0,44\%$ in $5,00\% \pm 2,96\%$. Če gledamo zraven tudi pasaži 10 in 13, vidimo da se delež pozitivnih celic v povprečju konstantno znižuje v gojišču MSCGM, v NHEM Plus pa delež najprej pada nato pa se malo poveča.



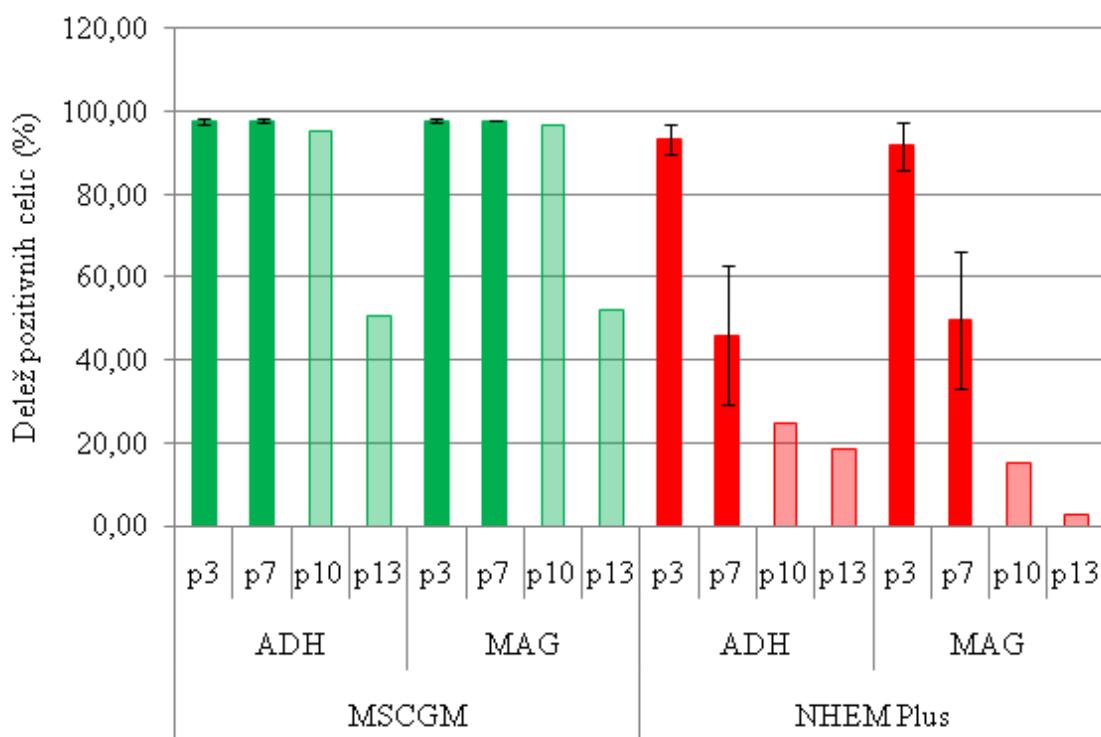
Slika 23: Vpliv gojenja na izražanje celičnega označevalca CD73. Na grafih so prikazani s pretočno citometrijo pridobljeni povprečni deleži celic pozitivnih za celični označevalci CD73 v p3 in p7, za p10 in p13 pa je prikazan rezultat vzorca KM73 (uporabljeni rezultati vzorcev KM64, KM66 in KM73). Legenda: p: pasaža, ADH: populacija izolirana z adherenco na plastiko, MAG: populacija izolirana z imunomagnetnim ločevanjem, MSCGM: gojišče namenjeno gojenju MMC podjetja Lonza, NHEM Plus: gojišče namenjeno gojenju MMC podjetja Miltenyi Biotec.

Analiza na pretočnem citometru je pokazala, da je v vseh analiziranih vzorcih v povprečju zelo velik delež CD73 pozitivnih celic in se med pasažami skoraj ne spreminja (**Slika 23**). Če primerjamo vse vzorce v pasažah 3 in 7, je v gojišču MSCGM v povprečju med $97,98\% \pm 0,37\%$ in $98,28\% \pm 0,31\%$ CD73 pozitivnih celic. V gojišču NHEM Plus pa je v povprečju med $88,14\% \pm 15,02\%$ in $98,18\% \pm 0,36\%$. Če gledamo zraven tudi pasaži 10 in 13, vidimo v povprečju zmanjševanje deleža pozitivnih celic v pasaži 13 v gojišču MSCGM, v NHEM Plus pa se delež od pasaže 7 konstantno zmanjšuje.



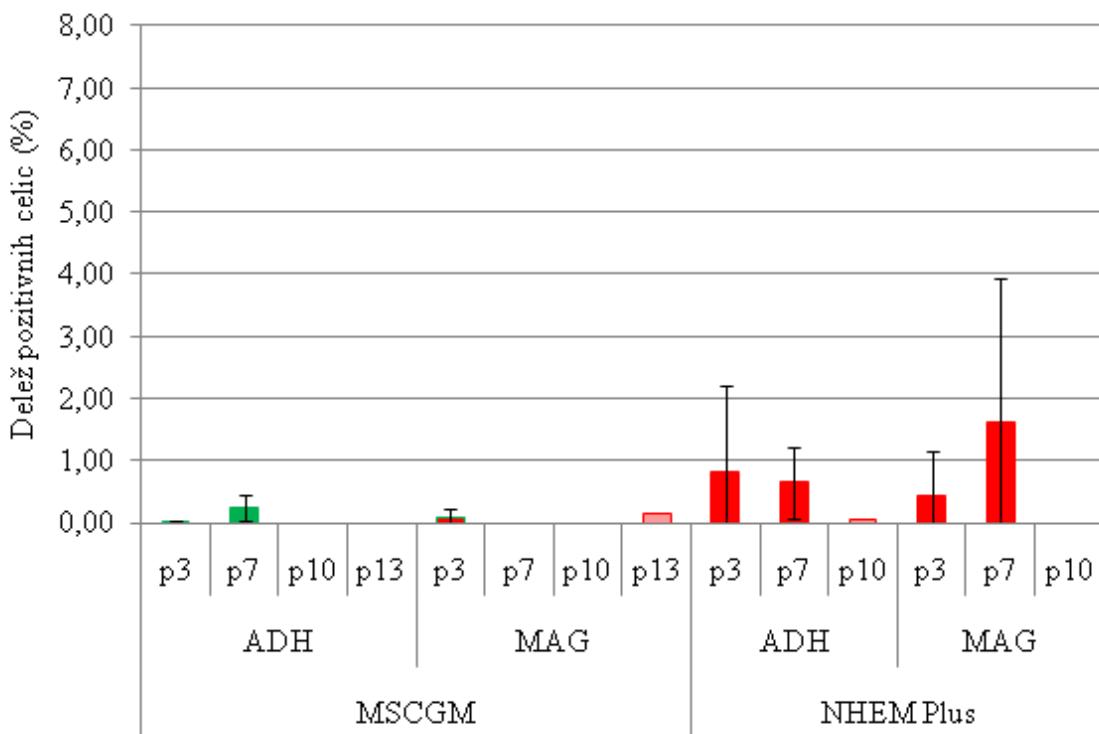
Slika 24: Vpliv gojenja na izražanje celičnega označevalca CD105. Na grafih so prikazani s pretočno citometrijo pridobljeni povprečni deleži celic pozitivnih za celični označevalci CD105 v p3 in p7, za p10 in p13 pa je prikazan rezultat vzorca KM73 (uporabljeni rezultati vzorcev KM64, KM66 in KM73). Legenda: p: pasaža, ADH: populacija izolirana z adherenco na plastiko, MAG: populacija izolirana z imunomagnetnim ločevanjem, MSCGM: gojišče namenjeno gojenju MMC podjetja Lonza, NHEM Plus: gojišče namenjeno gojenju MMC podjetja Miltenyi Biotec.

Analiza na pretočnem citometru je pokazala, da je v vseh analiziranih vzorcih v povprečju po večini majhen delež CD105 pozitivnih celic (**Slika 24**). Če primerjamo vse vzorce v pasažah 3 in 7, je v gojišču MSCGM v povprečju med $1,95\% \pm 1,36\%$ in $27,36\% \pm 43,83\%$ CD105 pozitivnih celic. V gojišču NHEM Plus pa je v povprečju med $3,05\% \pm 3,05\%$ in $10,38\% \pm 7,40\%$. Odstopanje je le pri pasaži 7 v gojišču MSCGM, kjer je pri KM73 verjetno prišlo do tehnične napake. Če gledamo zraven tudi pasaži 10 in 13, vidimo da se v povprečju delež pozitivnih celic ne glede na gojišče konstantno zmanjšuje.



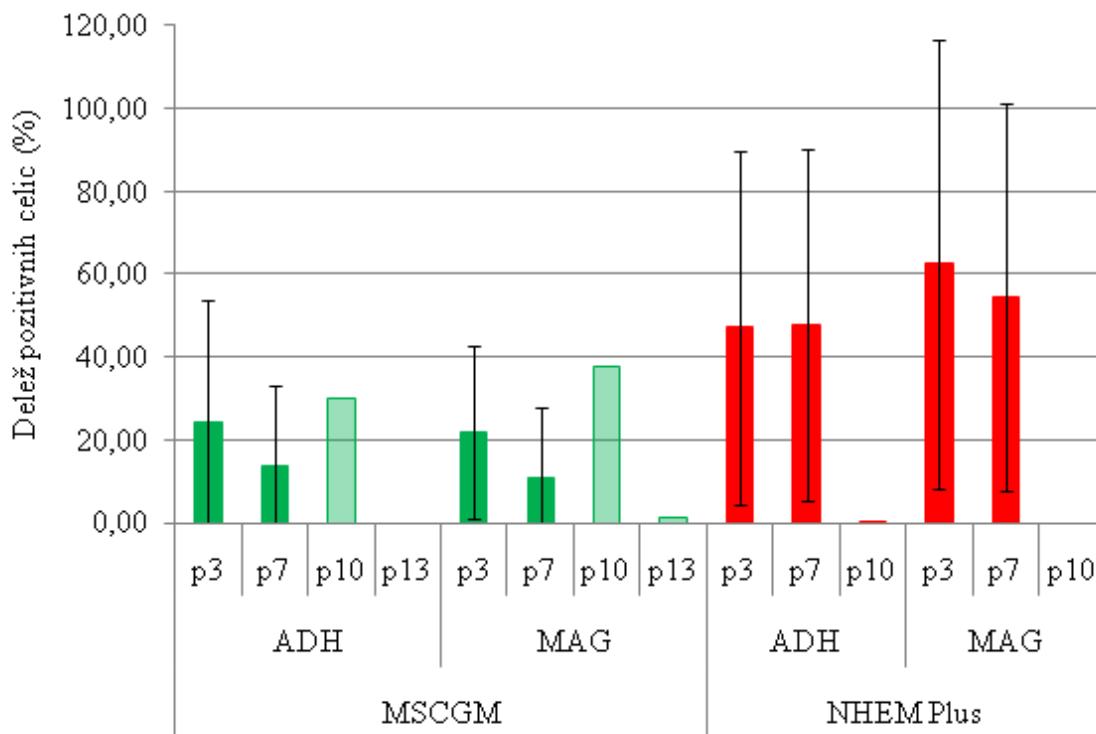
Slika 25: Vpliv gojenja na izražanje celičnega označevalca CD166. Na grafih so prikazani s pretočno citometrijo pridobljeni povprečni deleži celic pozitivnih za celični označevalci CD166 v p3 in p7, za p10 in p13 pa je prikazan rezultat vzorca KM73 (uporabljeni rezultati vzorcev KM64, KM66 in KM73). Legenda: p: pasaža, ADH: populacija izolirana z adherenco na plastiko, MAG: populacija izolirana z imunomagnetnim ločevanjem, MSCGM: gojišče namenjeno gojenju MMC podjetja Lonza, NHEM Plus: gojišče namenjeno gojenju MMC podjetja Miltenyi Biotec.

Analiza na pretočnem citometru je pokazala, da je v vseh analiziranih vzorcih v povprečju zelo velik delež CD166 pozitivnih celic. Njegov delež se enako spreminja znotraj posameznega gojišča (**Slika 25**). Če primerjamo vse vzorce v pasažah 3 in 7, je v gojišču MSCGM v povprečju med $97,85\% \pm 0,43\%$ in $97,60\% \pm 0,90\%$ CD166 pozitivnih celic in delež se ne spreminja. V gojišču NHEM Plus pa je v povprečju med $46,01\% \pm 16,69\%$ in $93,22\% \pm 3,55\%$, njihov delež pada v pasaži 7. Če gledamo zraven tudi pasaži 10 in 13, vidimo v povprečju zmanjševanje deleža pozitivnih celic v pasaži 13 v gojišču MSCGM, v NHEM Plus pa delež konstantno pada.



Slika 26: Vpliv gojenja na izražanje celičnega označevalca CD45. Na grafih so prikazani s pretočno citometrijo pridobljeni povprečni deleži celic pozitivnih za celični označevalci CD45 v p3 in p7, za p10 in p13 pa je prikazan rezultat vzorca KM73 (uporabljeni rezultati vzorcev KM64, KM66 in KM73). Legenda: p: pasaža, ADH: populacija izolirana z adherenco na plastiko, MAG: populacija izolirana z imunomagnetskim ločevanjem, MSCGM: gojišče namenjeno gojenju MMC podjetja Lonza, NHEM Plus: gojišče namenjeno gojenju MMC podjetja Miltenyi Biotec.

Analiza na pretočnem citometru je pokazala, da je v vseh analiziranih vzorcih v povprečju po večini zanemarljiv delež CD45 pozitivnih celic. Delež teh celic nima povezave s pasažo in gojiščem (**Slika 26**). Delež pozitivnih celic je višji od pričakovanja v gojišču NHEM Plus pri pasaži 3 in 7. Če primerjamo vse vzorce v pasažah 3 in 7, je v gojišču MSCGM v povprečju med $0,00\% \pm 0,00\%$ in $0,24\% \pm 0,21\%$ CD45 pozitivnih celic. V gojišču NHEM Plus pa v povprečju med $0,64\% \pm 0,56\%$ in $1,60\% \pm 2,32\%$. Če gledamo zraven tudi pasaži 10 in 13 pri gojišču MSCGM, je v povprečju delež pozitivnih celic zanemarljiv. Če gledamo v gojišču NHEM Plus tudi pasažo 10, pa v nekaterih pasažah delež odstopa od pričakovanj.

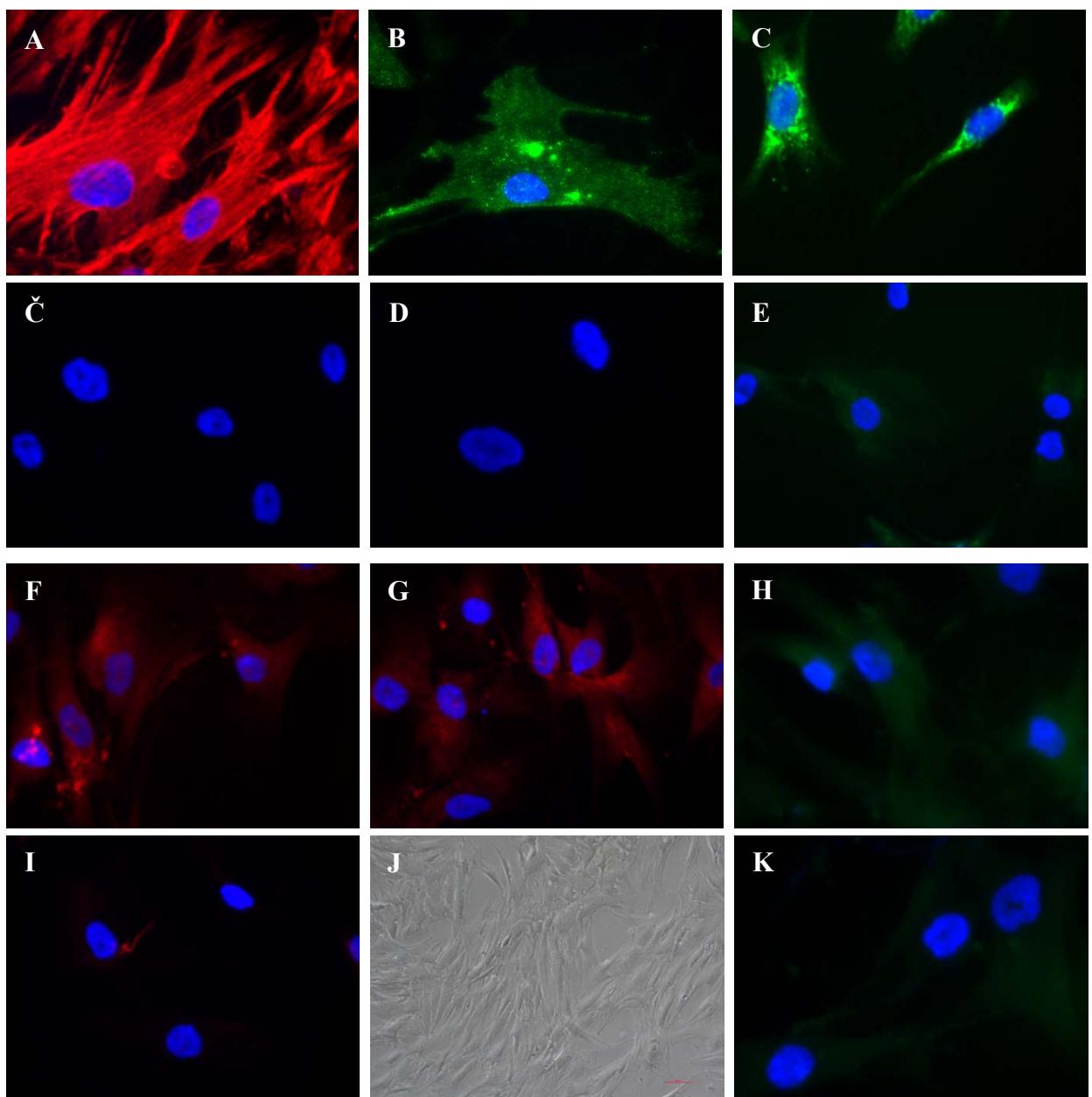


Slika 27: Vpliv gojenja na izražanje celičnega označevalca CD271. Na grafih so prikazani s pretočno citometrijo pridobljeni povprečni deleži celič pozitivnih za celični označevalci CD271 v p3 in p7, za p10 in p13 pa je prikazan rezultat vzorca KM73 (uporabljeni rezultati vzorcev KM64, KM66 in KM73). Legenda: p: pasaža, ADH: populacija izolirana z adherenco na plastiko, MAG: populacija izolirana z imunomagnetnim ločevanjem, MSCGM: gojišče namenjeno gojenju MMC podjetja Lonza, NHEM Plus: gojišče namenjeno gojenju MMC podjetja Miltenyi Biotec.

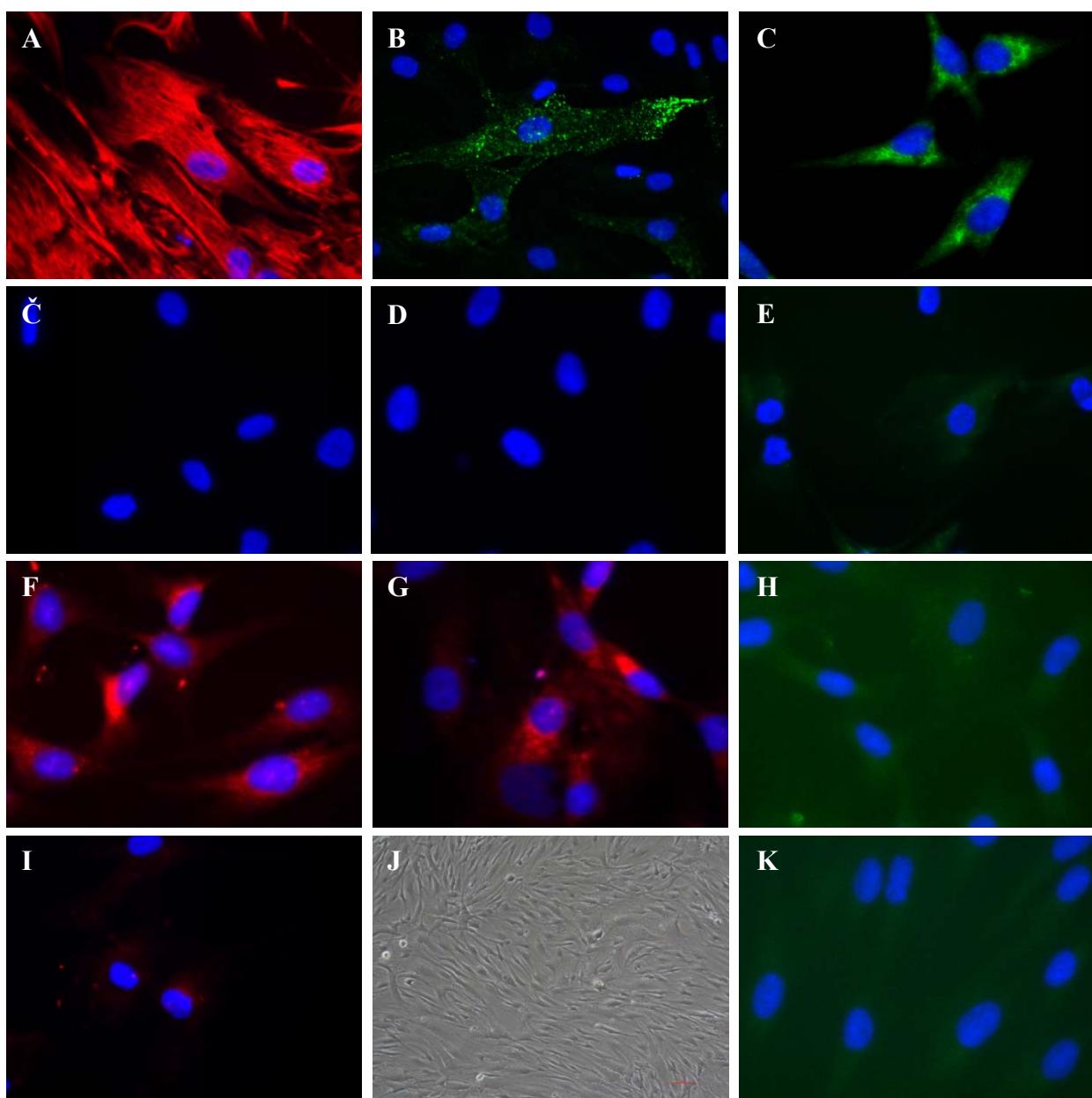
Analiza na pretočnem citometru je pokazala, da se delež CD271 pozitivnih celič znatno posameznega gojišča v povprečju enako spreminja (**Slika 27**). Če primerjamo vse vzorce v pasažah 3 in 7, je v gojišču MSCGM v povprečju med $10,86\% \pm 17,03\%$ in $24,19\% \pm 29,43\%$ CD271 pozitivnih celič. V gojišču NHEM Plus pa v povprečju med $47,20\% \pm 42,73\%$ in $62,38\% \pm 54,03\%$. Če gledamo zraven tudi pasaži 10 in 13 pri gojišču MSCGM, delež pozitivnih celič v povprečju postopoma pada, enako velja za gojišče NHEM Plus.

4.6 IMUNOBARVANJE

Gojene MMC iz pasaže 3 vzorca KM61 (populacija ADH) v gojišču MSCGM in KM62 (populacija MAG) v gojišču NHEM Plus smo označili s mišjimi protitelesi proti humanim celičnim označevalcem vimentin, CD73, CD90, CD105, CD166, CD45 in ustreznnimi kontrolami (**Preglednica 14**). Obarvanje za celični označevalci vimentin predstavlja pozitivno kontrolo, barvanje za celični označevalci CD45 pa negativno kontrolo.



Slika 28: Populacija ADH gojena v gojišču MSCGM v pasaži 3 pobarvana za celične označevalce in njihove kontrole (Preglednica 14) za KM61. A: rdeče je označen vimentin, Č: negativna kontrola za vimentin, B: zeleno je označen CD90, D: negativna kontrola za CD90, C: zeleno je označen CD105, E: negativna kontrola za CD105, F: rdeče je označen CD73, G: rdeče je označen CD166 in I: negativna kontrola za CD73 in CD166, H: zeleno je označen CD45, K: negativna kontrola za CD45 in J: fazni kontrast (100-kratna povečava). Modro soobarvana celična jedra.



Slika 29: Populacija MAG gojena v gojišču NHEM Plus v pasaži 3 pobarvana za celične označevalce in njihove kontrole (Preglednica 14) za KM62. A: rdeče je označen vimentin, Č: negativna kontrola za vimentin, B: zeleno je označen CD90, D: negativna kontrola za CD90, C: zeleno je označen CD105, E: negativna kontrola za CD105, F: rdeče je označen CD73, G: rdeče je označen CD166 in I: negativna kontrola za CD73 in CD166, H: zeleno je označen CD45, K: negativna kontrola za CD45 in J: fazni kontrast (100-kratna povečava). Modro so barvana celična jedra.

S postopkom imunobarvanja smo dobili pričakovane rezultate. Populacija ADH gojena v gojišču MSCGM (**Slike 28A-K**) in populacija MAG gojena v gojišču NHEM Plus (**Slike 29A-K**) sta pozitivni za celične označevalce vimentin, CD73, CD90, CD105 in CD166 ter negativni za CD45.

Med gojenjem celic smo enako kot s pretočno citometrijo preverjali prisotnost celičnega označevalca CD90 pri vseh kombinacijah populacij ADH in MAG ter gojišču MSCGM in NHEM Plus v pasaži 3 in 7 z uporabo ustreznega mišjega protitelesa proti humanim celičnim označevalcu CD90 in ustrezne kontrole (**Preglednica 14**). Vse kombinacije so bile pozitivne na celični označevalec CD90.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomskem delu smo primerjali metodi osamitve MMC iz humanega KM z imunomagnetskim ločevanjem in adherenco na plastiko. Dobljene populacije MMC smo nato gojili v dveh različnih gojiščih, da bi našli optimalno kombinacijo med načinom osamitve in uporabljenim gojiščem. Celice smo tudi okarakterizirali s površinskimi celičnimi označevalci, značilnimi za MMC in s tem določili njihovo istovetnost oz. uniformnost med gojenjem. Prav tako smo za dva vzorca preverili osteodiferencijske sposobnosti populacij MMC gojenih v obeh gojiščih. S kombinacijo prisotnosti celičnih označevalcev in sposobnosti osteodiferenciacije populacij MMC smo določili, do katere pasaže lahko gojimo MMC, ne da bi se jim pri tem spremenile fenotipske, proliferacijske in osteodiferencijske sposobnosti.

Punktate darovanih vzorcev KM smo pridobili na Kliničnem oddelku za hematologijo v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani. Po osamitvi z gradientnim centrifugiranjem z uporabo Lymphlyte-H smo s štetjem z napravo Vi-Cell XR pridobili med $3,1 \times 10^7$ MNC/ml in $54,5 \times 10^7$ MNC/ml. Njihova viabilnost je bila med 86,4% in 98,9%. Vzroki za variabilno število izoliranih MNC so različni volumni vzorcev (4-7 ml), različne starosti in splošno zdravstveno stanje darovalcev. Starost darovalcev je bila med 21 in 84 let.

Temu koraku je sledila osamitev MMC na dva načina. Prvi način je bilo imunomagnetno ločevanje z uporabo kompleta reagentov CD271 MicroBeads s pripadajočim gojiščem NHEM (uporabljamo ga po osamitvi do začetka pasažiranja celic) in NHEM Plus (uporabljamo ga za pasažiranje celic, saj vsebuje mešanico citokinov, ki pospešujejo proliferacijo MMC). Drugi način je adherenca celic na plastiko s pripadajočim gojiščem MSCGM (uporablja se ga za gojenje in dobro proliferacijo MMC in se je v preteklosti izkazal kot najboljši izbor gojenja MMC na Zavodu RS za transfuzijsko medicino).

Z imunomagnetskim ločevanjem smo po osamitvi pridobili med 69.000 in 262.000 celic (**Slika 11, Preglednica 15**). Glede na število celic po osamitvi opazimo, da s časom učinkovitost kompleta reagentov pada. Vzrok bi lahko bil, da so reagenti z odprtjem postali manj učinkoviti oziroma je med tem uporabnost kompleta reagentov zapadla (**Slika 12 in Preglednica 15**). Tako lahko zaključimo, da v našem primeru komplet reagentov ni bil najbolj primeren za učinkovito osamitev MMC na celični označevalec CD271. Pričakovali smo namreč okoli 250.000 celic, ki smo jih dobili še v roku 5 dni po odprtju kompleta reagentov, med 49. in 55. dnevom po odprtju smo pridobili med 106.000 in 146.000 celic, med 63. in 77. dnevom pa smo pridobili med 69.000 in 78.000 celic. To smo za en primer potrdili s pretočno citometrijo, kjer smo analizirali vzorec KM77 in ugotovili, da je v

negativni frakciji prisotnih še vedno 0,17% CD271 pozitivnih celic, medtem kot je začetna frakcija vsebovala 0,22% teh celic (**Preglednica 17**).

Ugotovili smo, da se v začetni frakciji oz. suspenziji MNC, ki smo jih osamili iz KM nahaja med 0,22% in 1,8% CD271 pozitivnih celic, torej v povprečju $0,92\% \pm 0,77\%$. To se sklada s podatki, ki jih navaja Miltenyi Biotec (2011), da je v KM med 0,5% in 3% CD271 pozitivnih celic. Enako Kucia in sod. (2010) navajajo, da je v suspenziji MNC iz KM $0,92\% \pm 0,2\%$ CD271 pozitivnih celic. Hkrati smo preverjali čistost pozitivne frakcije, ki smo jo pridobili v roku 77 dni od odprtja kompleta reagentov, in ugotovili, da pridobimo s to metodo od 29,69% do 72,96% CD271 pozitivnih celic torej v povprečju $50,89\% \pm 16,09\%$. S tem smo se dobro približali zagotovilu Miltenyi Biotec (2011), ki pravi, da lahko z uporabo ene kolone, kot smo delali mi, pridobimo okoli 20% čistost frakcije. Če pa bi uporabili dve koloni, bi po zagotovilu Miltenyi Biotec (2011) lahko pričakovali $> 85\%$ čistost frakcije. To čistost smo dosegli brez uporabe dveh kolon pri vzorcu KM67, kjer je bila 72,96% čistost. Vrednost 29,69% za KM77 lepo ponazarja, da je komplet reagentov po pretečenih 77 dneh od odprtja skoraj neuporaben. V začetni frakciji KM77 smo imeli 0,22% CD271 pozitivnih celic, v negativni frakciji pa nam je ostalo še 0,17% celic. Vzrok bi lahko bil v tem, da so sekundarna protitelesa z magnetnimi delci specifična proti fluorokromu PE s časom postala neučinkovita in so izpustila večji delež CD271 pozitivnih celic, kljub temu, da so bila označena s specifičnim protitelesom označenim s PE. Zato smo te celice zaznali v negativni frakciji. Da bi to potrdili, bi morali pri vseh vzorcih preverjati delež CD271 pozitivnih celic v negativni frakciji. Izkoristki imunomagnetnega ločevanja so bili v povprečju $26\% \pm 9\%$ (**Preglednica 17**), ker je več kot navaja avtor Quirici in sod. (2002), njihovi izkoristki so bili $12 \pm 4\%$.

Glede na objave Quirici in sod. (2002), Jones in sod. (2006), Bühring in sod. (2007), Jaroča in sod. (2008), Horn in sod. (2008), Battula in sod. (2009), Bieback in sod. (2009), Bühring in sod. (2009), Poloni in sod. (2009) ter Sobiesiak in sod. (2010) je komplet reagentov CD271 MicroBeads zanesljivo primeren za osamitev MMC na podlagi celičnega označevalca CD271, česar pa mi nismo mogli popolnoma dokazati. Kljub visokim izkoristkom smo pridobili manj celic, kot smo jih pričakovali.

Ker sta osnovna principa obeh metod osamitve različna, je edini način njune primerjave možen na nivoju posameznega vzorca KM. Zato smo za vsako metodo osamitve, tako za imunomagnetno ločevanje kot za adherenco na plastiko, uporabili po 3×10^7 MNC istega KM. S tem smo zagotovili zadostno število celic za nadaljnje gojenje. Celice, ki smo jih osamili z imunomagnetskim ločevanjem, smo gojili v gojišču NHEM Plus. Celice, ki smo jih osamili z adherenco na plastiko, pa v gojišču MSCGM. Po 14 dneh gojenja so celice dosegle 70 - 90% konfluenco (**Slika 13**), zato so bile primerne za tripsinizacijo in štetje. Šele na tem koraku smo pridobili podatke za primerjavo uspešnosti osamitve. Število celic v gojišču NHEM Plus po 14 dneh je bilo med 4.000 in 168.500, pri dveh vzorcih pa celice v kulturi niso preživele. Razlog za to bi lahko bil, da smo celice pregrobo iztisnili iz kolone. Število celic v gojišču MSCGM pa je bilo med 178.000 in 574.000. Tako smo primerjali število celic pri 9 vzorcih KM in iz dobljenih podatkov izračunali povprečno število celic, ki smo jih osamili z vsako metodo. V povprečju smo z imunomagnetskim ločevanjem osamili 86.714 celic, vendar njihovo število variira za 68.117. Z metodo adherence na plastiko pa v povprečju pridobimo 337.556 celic, njihovo število pa variira za

128.949 celic (**Preglednica 15**). Iz podatkov lahko zaključimo, da v primerjavi s klasično metodo adherence na plastiko, imunomagnetno ločevanje na celični označevalec CD271 ni boljše. Kar pa ni v skladu z ugotovitvami avtorjev Quirici in sod. (2002), Jarocha in sod. (2008) ter Poloni in sod. (2009).

V drugem delu diplomske naloge nas je zanimalo, katera kombinacija osamitve in gojišča je najboljša. Za ta poskus smo kombinirali izolirane populacije z adherenco na plastiko in imunomagnetnim ločevanjem z dvema gojiščema MSCGM in NHEM Plus. Zanimalo nas je, kako se izolirani populaciji obnašata v vsakem gojišču. Rezultat tega poskusa so bile štiri rastne krivulje za vsak vzorec KM. Za določanje števila celic lahko uporabimo najrazličnejše metode. Nekatere temeljijo na spektrofotometriji in so odvisne od metabolne aktivnosti celic. Problem teh metod je, da celice niso vedno enako aktivne, zato določanje števila celic na ta način ni vedno zanesljivo. Mi smo se odločili za štetje celic po tripsinizaciji z uporabo števne komore.

Dva vzorca kostnega mozga, KM64 in KM66 smo gojili do pasaže 7. Pasaža 7 je še vedno dovolj zgodnja, da ne pride do senescence ali fenotipskih sprememb celic, hkrati pa nam omogoča namnožitev celic v zadostnem številu za uporabo v regenerativni medicini. Pri obeh vzorcih se je izkazala za najboljšo kombinacijo metoda osamitve z adherenco na plastiko in gojišče MSCGM (**Slika 14A in 14 B**). Ker krivulje pri pasaži 7 niso dosegle platoja rasti, smo se odločili, da bomo KM68 gojili do pasaže 10. Tudi tukaj je prevladala kombinacija osamitve z adherenco na plastiko in gojišče MSCGM (**Slika 14C**). Opazili smo tudi, da se začne število celic gojenih v gojišču NHEM Plus zmanjševati po pasaži 8. To je bil edini primer, kjer smo pridobili največ celic pri osamitvi z adherenco na plastiko ne glede na gojišče. Da bi ugotovili, ali je to zgolj izjema ali se v kasnejših pasažah krivulji za gojišče MSCGM obrneta navzdol, smo vzorca KM69 in KM73 gojili do pasaže 12. Pri obeh KM so se hitreje pomnoževale celice gojene v MSCGM (**Slika 14C in 14D**). Tudi pri teh dveh vzorcih se je začelo zmanjševati število celic pri pasaži 9 za celice v NHEM Plus. Pri tej pasaži smo z gojenjem zaključili, ker so se celice v NHEM Plus zelo slabo podvojevale in primerjava ni bi bila več smiselna. Iz tega lahko zaključimo, da je najboljša kombinacija populacija ADH in gojišče MSCGM, sledi ji populacija MAG v enakem gojišču.

Wagner in Ho (2007) navajata, da lahko MMC *in vitro* gojimo omejen čas, med 8 in 15 pasaž oziroma med 25 in 40 populacijskih podvojevanj. To smo opazovali na rastni krivulji za vzorec KM73 (**Slika 14D**), ki je najlepši primer rastne krivulje za obe gojišči. Ugotovili smo, da bi MMC ne glede na način osamitve v gojišču MSCGM lahko gojili dlje kot do pasaže 12, verjetno bi dobro rastne do pasaže 15. V gojišču NHEM Plus pa je bilo MMC smiselno gojiti do pasaže 9. Tako smo z obema gojiščema v območju, ki ga predlagata oba avtorja. Za boljše rezultate bi bilo potrebno poskus ponoviti na večjem številu vzorcev KM in jih opazovati do pasaže 15.

Iz vseh rastnih krivulj smo ugotovili, da je najboljša kombinacija osamitve z adherenco na plastiko in gojišče MSCGM, sledi ji osamitev z imunomagnetnim ločevanjem v enakem gojišču. To ni v skladu z ugotovitvijo Quirici in sod. (2002), ki trdijo, da imajo CD271 pozitivne celice od 10- do 1000-krat višjo sposobnost proliferacije kot MMC, ki jih osamimo z adherenco na plastiko. Število celic v gojišču NHEM Plus začne padati med

pasažo 8 in 9. V gojišču NHEM Plus začne število celic izraziteje rasti (eksponentna faza rasti) med pasažami 1 in 3, vendar jih celice gojene v gojišču MSCGM, kljub kasnejši eksponentni fazi med pasažami 3 in 5, prekašajo med pasažami 5 in 8.

Med gojenjem celic za analizo dinamike rasti smo preverjali tudi do katere pasaže MMC ohranajo značilen fenotip in sposobnost diferenciacije. MMC smo s pretočno citometrijo okarakterizirali na zanje značilne celične označevalce Stro-1, CD73, CD105, CD166 in CD45. Z imunobarvanjem pa smo določili, da so vse celice v pasaži 3 in 7 v vseh kombinacijah pozitivne za CD90. Sposobnost diferenciacije smo preverjali z njihovo sposobnostjo osteodiferenciacije.

Analiza na pretočnem citometru je pokazala, da je v vseh analiziranih vzorcih v povprečju majhen delež Stro-1 pozitivnih celic, ki niha ne glede na pasažo in gojišče. Če primerjamo vse vzorce v pasažah 3 in 7 je v gojišču MSCGM v povprečju med $1,88\% \pm 1,59\%$ in $3,91\% \pm 2,70\%$ Stro-1 pozitivnih celic. V gojišču NHEM Plus pa je v povprečju med $0,32\% \pm 0,44\%$ in $5,00\% \pm 2,96\%$. Če gledamo zraven tudi pasaži 10 in 13, vidimo da se delež pozitivnih celic v povprečju pri gojišče MSCGM konstantno znižuje, v NHEM Plus pa najprej pade nato pa se poveča (**Slika 22**).

Prav tako je v vseh analiziranih vzorcih v povprečju zelo velik delež CD73 pozitivnih celic, ki je dokaj konstanten. Če primerjamo vse vzorce v pasažah 3 in 7 je v gojišču MSCGM v povprečju med $97,98\% \pm 0,37\%$ in $98,28\% \pm 0,31\%$ CD73 pozitivnih celic. V gojišču NHEM Plus pa je v povprečju med $88,14\% \pm 15,02\%$ in $98,18\% \pm 0,36\%$. Če gledamo zraven tudi pasaži 10 in 13, vidimo v povprečju zmanjševanje deleža pozitivnih celic v pasaži 13 v gojišču MSCGM, v NHEM Plus pa se delež od pasaže 7 konstantno zmanjšuje (**Slika 23**).

Skoraj v vseh analiziranih vzorcih je v povprečju majhen delež CD105 pozitivnih celic. Če primerjamo vse vzorce v pasažah 3 in 7, je v gojišču MSCGM v povprečju med $1,95\% \pm 1,36\%$ in $27,36\% \pm 43,83\%$ CD105 pozitivnih celic. V gojišču NHEM Plus pa je v povprečju med $3,75\% \pm 3,05\%$ in $10,38\% \pm 7,40\%$. Odstopanje je le pri pasaži 7 v gojišču MSCGM, kjer je pri KM73 verjetno prišlo do tehnične napake. To je razvidno tudi iz velikega standardnega odklona. Če gledamo zraven tudi pasaži 10 in 13, vidimo, da se v povprečju delež pozitivnih celic ne glede na gojišče konstantno zmanjšuje (**Slika 24**).

V vseh analiziranih vzorcih je tudi v povprečju zelo velik delež CD166 pozitivnih celic. Njegov delež se enako spreminja znotraj posameznega gojišča. Če primerjamo vse vzorce v pasažah 3 in 7, je v gojišču MSCGM v povprečju med $97,85\% \pm 0,43\%$ in $97,60\% \pm 0,90\%$ CD166 pozitivnih celic in delež se ne spreminja. V gojišču NHEM Plus pa je v povprečju med $46,01\% \pm 16,69\%$ in $93,22\% \pm 3,55\%$, njihov delež pade v pasaži 7. Če gledamo zraven tudi pasaži 10 in 13, vidimo v povprečju zmanjševanje deleža pozitivnih celic v pasaži 13 v gojišču MSCGM, v NHEM Plus pa se delež tekom pasaž postopno zmanjšuje (**Slika 25**).

Poleg tega smo ugotovili, da je v večini analiziranih vzorcih v povprečju zanemarljiv delež CD45 pozitivnih celic. Delež teh celic nima povezave s pasažo in gojiščem. Delež pozitivnih celic je v povprečju višji od pričakovanja v gojišču NHEM Plus pri pasaži 3 in

7. Če primerjamo vse vzorce v pasažah 3 in 7, je v gojišču MSCGM v povprečju med $0,00\% \pm 0,00\%$ in $0,24\% \pm 0,21\%$ CD45 pozitivnih celic. V gojišču NHEM Plus pa je v povprečju med $0,64\% \pm 0,56\%$ in $1,60\% \pm 2,32\%$. Če gledamo zraven tudi pasaži 10 in 13 pri gojišču MSCGM, je delež pozitivnih celic zanemarljiv. Če gledamo v gojišču NHEM Plus tudi pasažo 10, pa je v nekaterih pasažah odstopa od pričakovanj, kar se tudi vidi iz standardnega odklona v pasaži 3 in 7 (**Slika 26**).

Zanimalo nas je, kaj se dogaja med gojenjem s celičnim označevalcem CD271. Ugotovili smo, da se v vseh analiziranih vzorcih znotraj posameznega gojišča v povprečju enako spreminja. Če primerjamo vse vzorce v pasažah 3 in 7, je v gojišču MSCGM v povprečju med $10,86\% \pm 17,03\%$ in $24,19\% \pm 29,43\%$ CD271 pozitivnih celic. V gojišču NHEM Plus pa je v povprečju med $47,20\% \pm 42,73\%$ in $62,38\% \pm 54,03\%$. Če gledamo zraven tudi pasaži 10 in 13 pri gojišču MSCGM, delež pozitivnih celic v povprečju postopoma pada enako velja za gojišče NHEM Plus. Vendar če gledamo posamezen vzorec KM delež pozitivnih celic v gojišču NHEM Plus, enkrat naraste, pade ali se ohranja, kar vidimo iz velikega intervala standardnega odklona (**Slika 27**).

Iz opažanj lahko zaključimo, da je najprimernejši gojišče MSCGM, tako za populacijo celic, ki smo jih osamili z adherenco na plastiko, kot z imunomagnetnim ločevanjem. V tem gojišču imajo vse celice prisotne celične označevalce značilne za fenotip MMC, in sicer so pozitivne za CD90, velik delež je močno pozitivnih za CD73 in CD166, majhen delež je pozitivnih na Stro-1 in CD105, in so negativne za CD45. Celični označevalci CD271 pa tekom pasaž izgine. Ugotovili smo, da celice do pasaže 10 izražajo ustrezni fenotip. To pa za gojišče NHEM Plus ne moremo trditi. Celice so pozitivne za CD90 in v večjem deležu za CD73 in CD166 ampak njun delež pade že v pasaži 7. Prav tako kot MSCGM so tudi te celice v povprečju šibko pozitivne za Stro-1 in CD105 ter so v majhnem deležu v nekaterih pasažah pozitivne na CD45. Delež CD271 pozitivnih celic pa se tekom pasaž med posameznimi vzorci KM močno spreminja.

Pri vseh kombinacijah je potekla osteodiferenciacija v pasaži 3 in 7. Celice v gojišču MSCGM so se uspešno diferencirale tudi v pasaži 10 oz. 11, teh podatkov za gojišče NHEM Plus nimamo, ker nismo imeli zadostnega števila celic za izvedbo tega testa (**Preglednica 16**). MMC gojene v gojišču MSCGM torej do pasaže 10 ohranjajo svojo sposobnost osteodiferenciacije, za MMC gojene v gojišču NHEM Plus pa smo njihovo sposobnost za diferenciacijo preverili le do pasaže 7, vendar menimo da se ohranil tudi v pasaži 10. Tekom našega poskusa nismo opazili razlik v osteodiferencijskem potencialu med celicami, ki smo jih osamili z adherenco na plastiko ali z imunomagnetno selekcijo znotraj enega gojišča. To je v nasprotju s poročanjem avtorjev Quirici in sod. (2002), Jaroča in sod. (2008), ki pravijo, da imajo celice izolirane z imunomagnetno selekcijo, boljšo sposobnost diferenciacije kot celice izolirane z adherenco na plastiko.

Povzamemo lahko, da je iz vidika karakterizacije na celične označevalce Stro-1, CD73, CD90, CD105, CD166 in CD45 ter sposobnosti osteodiferenciacije najbolj smiselno gojiti celice v gojišču MSCGM in ne v NHEM Plus. Torej smo z obema metodama osamitve uspešno osamili MMC, vendar populacije med gojenem v gojišču NHEM Plus izgubljajo fenotipske lastnosti MMC, zato jih lahko gojimo samo do pasaže 7. Za razliko od njih so celice gojene v gojišču MSCGM dalj časa fenotipsko podobne MMC, tako da jih lahko

gojimo do pasaže 10. Seveda bi bilo za dodatno preverjanje trditve potrebno analizirati večje število zdravih vzorcev KM.

Če upoštevamo smernice Komiteja za mezenhimske in tkivne matične celice mednarodnega združenja za celično terapijo (ISCT) za humane MMC (Dominici in sod., 2006), je izmed uporabljenih metod osamitve in gojenja najprimernejša metoda osamitve MMC z adherenco na plastiko in gojenje v gojišču MSCGM do pasaže 10. Tako zadostimo vsem merilom ISCT, do odstopanja pride le pri celičnem označevalcu CD105, ki naj bi se izražal na večjem deležu MMC.

5.2 SKLEPI

- Ugotovili smo, da je osamitev z adherenco na plastiko primernejša metoda za pridobivanje MMC kot imunomagnetno ločevanje.
- Z obema metodama smo uspešno osamili MMC, pozitivne za celične označevalce Stro-1, CD73, CD90, CD105 in negativne za CD45 ter sposobne osteodiferenciacije.
- Celice, ki smo jih osamili z imunomagnetskim ločevanjem in adherenco na plastiko, najbolje rastejo in izražajo značilne celične označevalce v gojišču MSCGM do pasaže 10.
- Gojišče MSCGM je v primerjavi z NHEM Plus cenejše, celice bolje proliferirajo in ohranljajo značilen fenotip MMC s sposobnostjo osteodiferenciacije.
- Za boljšo primerjavo metod osamitve in opredelitev najboljše kombinacije metode osamitve in gojišča bi bilo potrebno pridobiti vzorce KM zdravih darovalcev ter analizirati večje število vzorcev.
- Delež CD271 pozitivnih celic se tekom pasaž v gojišču MSCGM zmanjšuje ali sploh ni prisoten, v gojišču NHEM Plus pa enkrat izginja, se pojavlja ali pa je konstantno prisoten. S tem celični označevalec ni primeren za karakterizacijo CD271 celic.

6 POVZETEK

V današnjem času večino poškodb in bolezni zdravimo s kirurškimi posegi in uporabo zdravil. Biotehnološke in biomedicinske raziskave pa odkrivajo vedno večji pomen novejših načinov zdravljenja z uporabo matičnih celic.

Matične celice (MC) so maloštevilna populacija nespecializiranih celic, ki jih najdemo v tkivu zarodka, pa tudi v tkivih odraslih živali in človeka. So nedefirencirane, po obliki podobne majhnim limfocitom in sposobne dolgotrajnega asimetričnega deljenja, pri čemer na eni strani tvorijo v procesu samoobnavljanja sebi identične kopije, na drugi strani pa nove linije bolj diferenciranih celic. Pri tem najprej nastanejo celice prednice (prekurzorji) in iz njih nato funkcionalne celice tkiv. Najdemo jih v vseh tkivih odraslega človeka (epitelu, prebavilih, skeletnih mišicah, očeh, jetrih, dojkah, zobni pulpi, koži, lasnih mešičkih, periferni krvi, maščobnem tkivu, testisih, prostatih, ovarijih) in so odgovorne za nadomeščanje odmrlih celic ali popravljanje poškodb. Z njimi je moč zdraviti določene degenerativne, presnovne, prirojene in rakaste bolezni, še bolj pa mehanske poškodbe tkiv in organov.

Za uporabo celic v terapevtske namene je ključnega pomena izbrati najprimernejše celice. Lastnosti takih celic so nezmožnost aktivacije imunskega odziva, netumorigenost, dokaj velika sposobnost diferenciacije v različne celične tipe, velika sposobnost proliferacije ter nesporen vir in način pridobivanja celic. Take celice so MMC, ki spadajo med stromalne celice KM in predstavljajo izvor celic za ne-hematopoetska tkiva ter hkrati hranilne celice za podporo rasti in diferenciacije krvnih celic in ostalih tkiv, saj sintetizirajo različne sestavine zunajceličnega matriksa in različne rastne dejavnike. So multipotentne celice, ta lastnost jim omogoča razvoj v celice mezodermalnega izvora (adipociti, osteoblasti, hondrocyti, mioblasti (npr. kardiomiociti)). MMC ne aktivirajo imunskega odziva, delujejo celo imunosupresivno, kar nam omogoča alogensko uporabo celic. Pod posebnimi pogoji se lahko transdiferencirajo v celice drugih kličnih plasti, npr. nevrone, s čemer postanejo MMC še bolj zanimive in uporabne.

Za uporabo MMC v terapevtske namene je pomembno, da imamo dobro definirane in ponovljive metode osamitve, proliferacije in diferenciacije celic. Optimalen izbor teh metod je ključen tako za raziskovalno delo, kot tudi za potencialno klinično uporabo celic. Zato smo v diplomskem delu primerjali metodi osamitev MMC iz humanega KM z imunomagnetskim ločevanjem in adherenco na plastiko. Dobljene populacije MMC smo nato gojili v dveh različnih gojiščih, da bi našli optimalno kombinacijo med načinom osamitve in uporabljenim gojiščem. Na več časovnih intervalih gojenja MMC smo določili fenotipski sestav za MMC značilnih celičnih označevalcev Stro-1, CD73, CD90, CD105, CD166 in CD45, s čemer smo preverjali njihovo uniformnost. Preverili smo tudi osteodiferencijsko sposobnosti MMC gojenih v obeh gojiščih. S kombinacijo prisotnosti celičnih označevalcev in analize sposobnosti osteodiferenciacije smo določili do katere pasaže lahko gojimo MMC, ne da bi se jim pri tem spremenile fenotipske, proliferacijske in osteodiferencijske sposobnosti.

Ugotovili smo, da je najprimernejši gojišče MSCGM, ne glede ali smo MMC osamili z adherenco na plastiko ali imunomagnetskim ločevanjem. V tem gojišču so imele vse celice

značilen fenotipski sestav MMC – so močno pozitivne za celične označevalce CD90, CD73 in CD166, majhen delež celic je bil pozitiven na Stro-1 in CD105 ter bile so negativne za CD45. MMC so ohranile svoj značilen fenotip in sposobnost osteodiferenciacije do pasaže 10. V gojišču NHEM Plus pa celice izgubijo značilen fenotip, delež CD73 in CD105 pozitivnih celic se po pasaži 7 zmanjšuje. Zaključili smo, da je optimalna metoda pridobitve MMC adherenca na plastiko v kombinaciji z uporabo gojišča MSCGM. S tem postopkom bi lahko pridobili dovolj celic ustreznega fenotipa in diferenciacijskega potenciala, ki bi bile primerne za uporabo v regenerativni medicini.

Naše delo predstavlja prispevek k biologiji MMC in s tem k regenerativni medicini. Upamo, da bo ta v naslednjem desetletju z uporabo MC postala najhitreje rastoča panoga medicine, še posebno, ko se bosta priključili tudi spremljajoča farmacevtska in biotehnološka industrija.

7 VIRI

- Alhadlaq A., Mao J.J. 2003. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *Journal of Dental Research*, 82: 951-956
- Amado L.C., Saliaris A.P., Schuleri K.H., St John M., Xie J.S., Cattaneo S., Durand D.J., Fitton T., Kuang J.Q., Stewart G., Lehrke S., Baumgartner W.W., Martin B.J., Heldman A.W., Hare J.M. 2005. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 11474-11479
- Aslan H., Zilberman Y., Kandel L., Liebergall M., Oskouian R.J., Gazit D., Gazit Z. 2006. Osteogenic differentiotion of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells*, 24 7: 1728-1737
- Baksh D., Zandstra P.W., Davies J.E. 2007. A non-contact suspension culture approach to the culture of osteogenic cells derived from a CD49elow subpopulation of human bone marrow-derived cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 98: 1195–1208
- Bang O.Y., Lee J.S., Lee P.H., Lee G. 2005. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Annals of Neurology*, 57: 874-882
- Battula V.L., Bareiss P.M., Treml S. 2007. Human palcenta and bone marrow driven MSC cultured in serum-free, b-FGF containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multi-lineage differentiation. *Differentiation*, 75, 4: 279-291
- Battula V.L., Treml S., Bareiss P.M., Gieseke F., Roelofs H., de Zwart P., Muller I., Schewe B., Skutella T., Fibbe W.E., Kanz L., Bühring H.J. 2009. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica*, 94: 173-84
- Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Gehron Robey P. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19: 180-192
- Bieback K., Hecker A., Kocaomer A., Lannert H., Schallmoser K., Strunk D., Kluter H. 2009. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*, 27: 2331-2341
- Borlongan C.V., Lind J.G., Dillon-Carter O., Yu G., Hadman M., Cheng C., Carroll J., Hess D.C. 2004. Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats. *Brain Research*, 1010: 108-116
- Bosio A., Huppert V., Donath S., Hennemann P., Malchow M., Heinlein U.A.O. 2009. Isolation and enrichment of stem cells. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 144: 43-72

- Brittan M., Chance V., Elia G., Poulsom R., Alison M.R., MacDonald T.T., Wright N.A. 2005. A regenerative role for bone marrow following experimental colitis: contribution to neovasculogenesis and myofibroblasts. *Gastroenterology*, 128: 1984-1995
- Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E. 1997. Growth kinetics, selfrenewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 64: 278-294
- Bühring H.J., Seiffert M., Bock T.A., Scheding S., Thiel A., Scheffold A., Kanz L., Brugger W. 1999. Expression of novel surface antigens on early hematopoietic cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 872: 25-39
- Bühring 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 Sciences*, 1106: 262-271
- Bühring H.J., Treml S., Cerabona F., de Zwart P., Kanz L., Sobiesiak M. 2009. Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1176: 124-134
- Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S., Bennett P.R., Bellantuono I., Fisk N.M. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98: 2396-2402
- Campioni D., Lanza F., Moretti S., Ferrari L., Cuneo A. 2008. Loss of Thy-1 (CD90) antigen expression on mesenchymal stromal cells from hematologic malignancies is induced by in vitro angiogenic stimuli and is associated with peculiar functional and phenotypic characteristics. *Cytotherapy*, 10, 1: 69-82
- Caneva L., Solido D., Cattoretti, De Harven E., Deliliers G.L. 1995. Immuno-electron microscopy characterization of human bone marrow stromal cells with anti-NGFR antibodies. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 21, 2: 73-85
- Caplan A.I., Dennis J.E. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98: 1076-1084
- Caplan A.I. 2009. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *Journal of Pathology*, 217: 318-324
- Cassaccia-Bonelli P., Carter B.D., Dobrpwsky R.T., Chao M.V. 1996. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature*, 383, 6602: 716-719
- Cedrlane. 2007. Lympholyte-H. Cedrlane: 4 str. (navodilo za uporabo)

- Chagraoui J., Lepage-Noll A., Anjo A., Uzan G., Charbord P. 2003. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood*, 101: 2973-2982
- Chen S.L., Fang W.W., Ye F., Liu Y.H., Qian J., Shan S.J., Zhang J.J., Chunhua R.Z., Liao L.M., Lin S., Sun J.P. 2004. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *American Journal of Cardiology*, 94: 92-95
- Choumerianou D.M., Dimitriou H., Kalmanti M. 2008. Stem cells: promises versus limitations. *Tissue Engineering*, 14: 53-60
- ClinicalTrials. 2011. U. S. National Institutes of Health. <http://clinicaltrials.gov/> (10. avg. 2011)
- Colter D.C., Class R., DiGirolamo C.M., Prockop D.J. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in culture of plastic adherence cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 3213-3218
- Conget P.A., Minguell J.J. 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cell Physiology*, 181: 67-73
- Da Silva Meirelles L., Caplan A.I., Nardi N.B. 2008. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26, 9: 2287-2299
- De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F.P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism*, 44: 1928-1942
- De Bari C., Dell'Accio F., Vandenabeele F., Vermeesch J.R., Raymackers J.M., Luyten F.P. 2003. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *The Journal of Cell Biology*, 160: 909-918
- De Ugarte D.A., Morizono K., Elbarbary A., Alfonso Z., Zuk P.A., Zhu M., Dragoo J.L., Ashjian P., Thomas B., Benhaim P., Chen I., Fraser J., Hedrick M.H. 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*, 174: 101-109
- Delorme B., Ringe J., Gallay N., Le Vern Y., Kerboeuf D., Jorgensen C., Rosset P., Sensebe L., Layrolle P., Haupl T., Charbord P. 2008. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood*, 111: 2631-2635
- Dennis J.E., Carbillot J.P., Caplan A.I., Charbord P. 2002. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*, 170: 73-82

- Deschaseaux F., Gindraux F., Saadi R., Obert L., Chalmers D., Herve P. 2003. Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45med, low phenotype. *British Journal of Haematology*, 122: 506-517
- Dexter T.M., Testa N.G. 1976. Differentiation and proliferation of hemopoietic cells in culture. *Methods in Cellular Biology*, 14: 387-405
- Dill T., Schächinger V., Rolf A. Möllmann S., Thiele H., Tillmanns H., Assmus B., Dimmeler S., Zeiher A.M., Hamm C. 2009. Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy. *American Heart Journal*, 157: 541-547
- Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanesi M., Longoni P.D., Matteucci P., Grisanti S., Gianni A.M. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99: 3838-3843
- Di Stefano P.S., Johnson E.M. 1988. Identification of a truncated form of the nerve growth factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 1: 270-274
- D'Ippolito G., Schiller P.C., Ricordi C., Roos B.A., Howard G.A. 1999. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14: 1115-1122
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8: 315-317
- Dragoo J.L., Samimi B., Zhu M., Hame S.L., Thomas B.J., Lieberman J.R., Hedrick M.H., Benhaim P. 2003. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infra patellar fat pads. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 85: 740-747
- Encina N.R., Billotte W.G., Hofmann M. C. 1999. Immunomagnetic isolation of osteoprogenitors from human bone marrow stroma. *Laboratory Investigation*, 79: 449-457
- Erices A., Conget P., Mingue J.J. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*, 109: 235-242
- FACSCalibur. 2011. University of Oklahoma Health Science Center. <http://www.ouhsc.edu/corelabs/FlowandImageCytometry/equipment/FACSCalibur.asp> (04. jul. 2011)

- Friedrich C., Zausch E., Sugrue S.P., Gutierrez-Ramos J.C. 1996. Hematopoietic supportive functions of mouse bone marrow and fetal liver microenvironment: dissection of granulocyte, B lymphocyte, and hematopoietic progenitor support at the stroma cell clone level. *Blood*, 87: 4596-4606
- Gang E.J., Jeong J.A., Hong S.H., Hwang S.H., Kim S.W., Ahn C., Han H., Kim H. 2004. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22, 4: 617-624
- Gang E.J., Bosnakovski D., Figueiredo C.A., Visser J.W., Perlingeiro R.C. 2007. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*, 109: 1743-1751
- GE Healthcare. 2010. Isolation of mononuclear cells: Methodology and applications. GE Healthcare: 20 str. (navodilo za uporabo)
- Gentry T., Foster S., Winstead L., Deibert E., Fiordalisi M., Balber A. 2007. Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy. *Cyotherapy*, 9, 3: 259-274
- Ghannam S., Bouffi C., Djouad F., Jorgensen C., Noel D. 2010. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Research and Therapy*, 1: 1-7
- Gimble J.M. 2003. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3: 705-713
- Gindraux F., Selmani Z., Obert L., Davani S., Tiberghien P., Herve P., Deschaseaux F. 2007. Human and rodent bone marrow mesenchymal stem cells that express primitive stem cell markers can be directly enriched by using the CD49a molecule. *Cell and Tissue Research*, 327: 471-483
- Givan A.L. 2001. Flow cytometry: First principles. 2nd ed. New York, John Wiley and Sons: 273 str.
- Gotherstrom C., Ringden O., Westgren M., Tammik C., Le Blanc K. 2003. Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplantation*, 32: 265-272
- Grauss R.W., van Tuyn J., Steendijk P., Winter E.M., Pijnappels D.A., Hogers B., Gittenberger-De Groot A.C., van der Geest R., van der Laarse A., de Vries A.A., Schalij M.J., Atsma D.E. 2008. Forced myocardin expression enhances the therapeutic effect of human mesenchymal stem cells after transplantation in ischemic mouse hearts. *Stem Cells*, 26: 1083-1093
- Gronthos S., Graves S.E., Ohta S., Simmons P.J. 1994. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*, 84: 4164-4173

- Gronthos S., Zannettino A.C., Graves S.E., Ohta S., Hay S.J., Simmons P.J. 1999. Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14, 1: 47-56
- Gronthos S., Zannettino A.C., Hay S.J. Shi S., Graves S.E., Kortesidis A., Simmons P.J. 2003. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of Cell Science*, 116: 1827-183
- Gronthos S., Fitter S., Diamond P., Simmons P.J., Itescu S., Zannettino A.C. 2007. A novel monoclonal antibody (STRO-3) identifies an isoform of tissue nonspecific alkaline phosphatase expressed by multipotent bone marrow stromal stem cells. *Stem Cells and Development*, 16: 953-963
- Gronthos S., Zannettino A.C. 2008. A method to isolate and purify human bone marrow stromal stem cells. *Methods in Molecular Biology*, 449: 45-57
- Gronthos S., McCarty R., Mrozik K., Fitter S., Paton S., Menocanon D., Itescu S., Bartold P.M., Xian C., Zannettion A.C. 2009. Heat shock protein-90 beta is expressed at the surface of multipotential mesenchymal precursor cells: generation of a novel monoclonal antibody, STRO-4, with specificity for mesenchymal precursor cells from human and ovine tissues. *Stem Cells and Development*, 18, 9: 1253-1262
- Hare J.M., Traverse J.H., Henry T.D., Dib N., Strumpf R.K., Schulman S.P., Gerstenblith G., DeMaria A.N., Denktas A.E., Gammon R.S., Hermiller J.B. Jr, Reisman M.A., Schaer G.L., Sherman W. 2009. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 54: 2277-2286
- Haynesworth S.E., Goshima J., Goldberg V.M., Caplan A.I. 1992. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 13: 81-88
- Hematopoietic and mesenchymal stromal cell pathway. 2011. Abcam. <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11815> (03. jul. 2011)
- Herrero C., Perez-Simon J.A. 2010. Immunodulatory effect of mesenchymal stem cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43, 5: 409-521
- Horn P., Bork S., Diehlmann A., Walenda T., Eckstein V., Ho A.D., Eagner W. 2008. Isolation of human mesenchymal stromal cells is more efficient by red blood cell lysis. *Cyotherapy*, 10: 676-685
- Horwitz E.M., Prockop D.J., Fitzpatrick L.A., Koo W.W., Gordon P.L., Neel M., Sussman M., Orchard P., Marx J.C., Pyeritz R.E., Brenner M.K. 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrowderived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Medicine*, 5: 309-313

- Huber L.J., Chao M.V. 1995. Mesenchymal and neuronal cell expression of the p75 neurotrophin receptor gene occur by different mechanisms. *Developmental Biology*, 167, 1: 227-238
- Hung S.C., Chen N.J., Hsieh S.L., Li H., Ma H.L., Lo W.H. 2002. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells*, 20: 249-258
- Huss R. 2000. Perspectives on the morphology and biology of CD34-negative stem cells. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*, 9: 783-793
- Ihan A. 1999. Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. Ljubljana, Kemomed: 7-18
- In't Anker P.S., Noort W.A., Scherjon S.A., Kleijburgvan der Keur C., Kruisselbrink A.B., van Bezooijen R.L., Beekhuizen W., Willemze R., Kanhai H.H., Fibbe W.E. 2003. Mesenchymal stem cells in human second trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*, 88: 845-852
- In't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburgvan der Keur C., de Groot-Swings G.M., Claas F.H., Fibbe W.E., Kanhai H.H. 2004. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*, 22: 1338-1345
- Jarocha D., Lukasiewicz E., Majka M. 2008. Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 46: 307-314
- Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49
- Jones E.A., English A., Kinsey S.E., Straszynski L., Emery P., Ponchel F., McGonagle D. 2006. Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytometry*, 70, 6: 391-399
- Jones E.A., Kinsey S.E., English A., Jones R.A., Straszynski L., Meredith D.M., Markham A.F., Jack A., Emery P., McGonagle D. 2002. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis & Rheumatism*, 46, 12: 3349-3360
- Kaiser S., Hackanson B., Follo M., Mehlhorn A., Geiger K., Ihorst G., Kapp U. 2007. BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD4 phenotype. *Cytotherapy*, 9: 439-450

- Kashiba H., Nouguchi K., Ueda Y., Senba E. 1995. Coexpression of trk family members and low-affinity neurotrophin receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Molecular Brain Research*, 30, 1: 158-164
- Kastrinaki M.C., Andreakou I., Charbord P., Papadaki H.A. 2008. Isolation of human bone marrow mesenchymal stem cells using different membrane markers: comparison of colony/cloning efficiency, differentiation potential, and molecular profile. *Tissue Engineering*, 14: 333-339
- Kaviani A., Perry T.E., Dzakovic A., Jennings R.W., Ziegler M.M., Fauza D.O. 2001. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. *Journal of Pediatric Surgery*, 36: 1662-1665
- Kiel M.J., Morrison S.J. 2008. Uncertainty in the niches that maintain hematopoietic stem cells. *Nature Reviews Immunology*, 8, 4: 290-301
- Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Lee C.W., Barr S., Fuchs S., Epstein S.E. 2004. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation Research*, 94, 5: 678-685
- Kogler G., Sensken S., Wernet P. 2006. Comparative generation and characterisation of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Experimental Hematology*, 34, 11: 1589-1595
- Kotnik V., Čurin-Šerbec V., Ihan A., Jeras M., Maovrh T., Simčič S., Škobrne M., Wraber B. 2001. Imunologija. Priročnik za vaje. Ljubljana, Medicinski razgledi: 13-17
- Kotobuki N., Hirose M., Takakura Y., Ohgushi H. 2004. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artificial Organs*, 28: 33-39
- Krampera M., Glennie S., Dyson J., Scott D., Laylor R., Simpson E., Dazzi F. 2003. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 101, 3722-3779
- Kuci S., Kuci Z., Kreyenberg H., Deak E., Pütsch K., Huenecke S., Amara K., Koller S., Rettinger E., Grez M., Koehl U., Latifi-Pupovci H., Henschler R., Tonn T., von Laer D., Klingebiel T., Bader P. 2010. CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. *Haematologica*, 95: 651-659
- Kucia M., Zuba-Surma E.K., Wysoczynski M., Wu W., Ratajczak J., Machalinski B., Ratajczak M.Z. 2007a. Adult marrow-derived very small embryonic-like stem cells and tissue engineering. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7: 1499-1514

- Kucia M., Wu W., Ratajczak M.Z. 2007b. Bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells: Their developmental origin and biological significance. *Developmental Dynamics*, 236, 12: 3309-3320
- Kucia M.J., Wysoczynski M., Wu W., Zuba-Surma E.K., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2008. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells*, 26, 8: 2083-2092
- Lazarus H.M., Koc O.N., Devine S.M., Curtin P., Maziarz R.T., Holland H.K., Shpall E.J., McCarthy P., Atkinson K., Cooper B.W., Gerson S.L., Laughlin M.J., Loberiza F.R. Jr, Moseley A.B., Bacigalupo A. 2005. Cotransplantation of HLA identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 11: 389-398
- Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K., Zetterberg E., Ringden O. 2003. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, 31: 890-896
- Lee O.K., Kou T.K., Chen W.M., Lee K.D., Hsieh S.L., Chen T.H. 2004. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103: 1669-1675
- Lee M.W., Yang M.S., Park J.S., Kim H.C., Kim Y.J., Choi J. 2005. Isolation of mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *International Journal of Hematology*, 81: 126-130
- Lee P.H., Kim J.W., Bang O.Y., Ahn Y.H., Joo I.S., Huh K. 2008. Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 83: 723-730
- Letchford J., Cardwell A.M., Stewart K., Coogans K.K., Cox J.P., Lee M., Beresford J.N., Perry M.J., Welham M.J. 2006. Isolation of C15: a novel antibody generated by phage display against mesenchymal stem cell-enriched fractions of adult human marrow. *Journal of Immunological Methods*, 308: 124-137
- Li Y., Chopp M., Chen J., Wang L., Gautam S.C., Xu Y.X., Zhang Z. 2000. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20: 1311-1319
- Liu P.G., Zhou D.B., Shen T. 2005. Identification of human bone marrow mesenchymal stem cells: preparation and utilization of two monoclonal antibodies against SH2, SH3. *Journal of Experimental Hematology*, 13, 4: 656-659
- Liu L., Sun Z., Chen B., Han Q., Liao L., Jia M., Cao Y., Ma J., Sun Q., Liu Z., Ai H., Thao R.C. 2006. Ex vivo expansion and in vivo infusion of bone marrow-derived Flk-1+CD31-. *Stem Cells and Development*, 15: 349-357

- Liu Z., Li Y., Zhang X., Savant-Bhonsale S., Chopp M. 2008. Contralesional axonal remodeling of the corticospinal system in adult rats after stroke and bone marrow stromal cell treatment. *Stroke*, 39: 2571-2577
- Ma Y., Xu Y., Xiao Z., Yang W., Zhang C., Song E., Du Y., Li L. 2006. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24: 315-321
- Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyaner D., Hardy W.B., Moorman M.A., McIntosh K.R., Mosca J.D. 2003. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Scienence*, 10, 2: 228-241
- Makino S., Fukuda K., Miyoshi S., Konishi F., Kodama H., Pan J., Sano M., Takahashi T., Hori S., Abe H., Hata J., Umezawa A., Ogawa S. 1999. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*, 103: 697-705
- Martinez C., Hofmann T.J., Marino R., Dominici M., Horwitz E. M. 2007. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood*, 109: 4245-4248
- Martin-Rendon E., Watt S.W. 2003. Stem cell plasticity. *British Journal of Hematology*, 122: 877-891
- Martins A.A., Paiva A., Morgado J.M., Gomes A., Pais M.K. 2009. Quantification and immunophenotypic characterization of bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cells by multicolor flow cytometry. *Transplantion Proceedings*, 41, 3: 943-946
- Miltenyi Biotec. 2007a. CD271 (LNGFR) MicroBead Kits, human. Miltenyi Biotec: 4 str. (navodila za uporabo)
- Miltenyi Biotec. 2007b. FcR Blocking Reagent, human. Miltenyi Biotec: 2 str. (navodila za uporabo)
- Miltenyi Biotec. 2008a. MACS Technology, Gold standard in cell separation. Miltenyi Biotec: 8 str. (katalog)
- Miltenyi Biotec. 2008b. MACS Cell Separation Strategies. Miltenyi Biotec: 2 str. (katalog)
- Miltenyi Biotec. 2008c. CytoMix - MSC, human. Miltenyi Biotec: 2 str. (navodila za uporabo)
- Miltenyi Biotec. 2011. »CD271 MicroBeads Kit, human – yield«. Bergisch Gladbach, Miltenyi Biotec, (osebni vir, 21. mar. 2011)

- Miyahara Y., Nagaya N., Kataoka M., Yanagawa B., Tanaka K., Hao H., Ishino K., Ishida H., Shimizu T., Kangawa K., Sano S., Okano T., Kitamura S., Mori H. 2006. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nature Medicine*, 12: 459-465
- Motaln H., Schichor C., Lah T.T., 2010. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer*, 166, 11: 2519-2530
- Mueller S.M., Glowacki J. 2001. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Journal of Cellular Biochemistry*, 82: 583-590
- Nakahara H., Dennis J.E., Bruder S.P., Haynesworth S.E., Lennon D.P., Caplan A.I. 1991. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal derived cells. *Experimantal Cell Research*, 195: 492-503
- Nakamura K., Ito Y., Kawano Y., Kurozumi K., Kobune M., Tsuda H., Bizen A., Honmou O., Niitsu Y., Hamada H. 2004. Antitumor effect of genetically enginered mesenchymal stem cell in rat glioma model. *Gene Therapy*, 11, 14: 1155-1164
- Nardi N.B., Meirelles L.S. 2006. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. V: *Handbook of Experimetal Pharmacology* 174. Wobus A.M., Boheler K. (eds.). Berlin, Springer: 249-282
- Nathanson M.A. 1985. Bone matrix-directed chondro genesis of muscle in vitro. *Clinical Orthopeadics and Related Research*, 200: 142-158
- Nishida S., Endo N., Yamagiwa H., Tanizawa T., Takahashi H.E. 1999. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 17: 171-177
- Noiseux N., Gnechi M., Lopez-Illasaca M., Zhang L., Solomon S.D., Deb A., Dzau V.J., Pratt R.E. 2006. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Molecular Therapy*; 14: 840-850
- Odabas S., Sayar F., Guven G., Yanikkaya-Demirel G., Piskin E. 2008. Separation of mesenchymal stem cells with magnetic nanosorbents carrying CD105 and CD73 antibodies in flow-through and batch systems. *Journal of Chromatography*, 861: 74-80
- Omori Y., Honmou O., Harada K., Suzuki J., Houkin K., Kocsis J.D. 2008. Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Research*, 1236: 30-38
- Ormerod M.G. 2008. Flow cytometry, A basic introduction. 3rd ed. New York, Oxford University Press: 116 str.

- Oswald J., Boxberger S., Jorgensen B., Feldmann S., Ehninger G., Bornhäuser M., Werner C. 2004. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, 22: 377-384
- Panepucci R.A., Siufi J.L., Silva W.A. Jr, Proto-Siquiera R., Neder L., Orellana M., Rocha V., Covas D.T., Zago M.A. 2004. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrowderived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 22: 1263-1278
- Pate D.W., Southerland D.A., Grande D.A., Young H.E., Lucas P.A. 1993. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from rabbit muscle. *Clinical Research*, 41: 374-378
- Peiffer I., Eid P., Barbet R., Li M.L., Oostendorp R.A., Haydout V., Monier M.N., Milon L., Fortunel N., Charbord P., Tovey M., Hatzfeld J., Hatzfeld A. 2007. A subpopulation of high proliferative potential-quiescent human mesenchymal stem cells is under the reversible control of interferon alpha/beta. *Leukemia*, 21: 714-724
- Pernick N. 2010a. CD Markers CD50 to CD99. *PathologyOutlines.com*. (3. sep. 2010). <http://pathologyoutlines.com/cd5099.html> (4. jul. 2011)
- Pernick N. 2010b. CD Markers CD100 to CD400. *PathologyOutlines.com*. (7. apr. 2010). <http://pathologyoutlines.com/cd100247.html> (4. jul. 2011)
- Pezzati P., Stanisz A.M., Marshall J.S., Nienenstock J., Stead R.H. 1992. Expression of nerve growth factor receptor immunoreactivity on follicular dendritic cells from human mucosa associated lymphoid tissues. *Immunology*, 76, 3: 485-490
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J., Moorman M., Simonetti D., Craig S., Marshak D.R. 1999. Multilineage potential of mesenchymal cells. *Science*, 284: 143-147
- Planat-Benard V., Menard C., Andre M., Puceat M., Perez A., Garcia-Verdugo J.M., Penicaud L., Casteilla L. 2004. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circulation Research*, 94: 223-229
- Poloni A., Maurizi G., Rosini V., Mondini E., Mancini S., Discepoli G., Biasio S., Battaglini G., Felicetti S., Berardinelli E., Serrani F., Leoni P. 2009. Selection of CD271(+) cells and human AB serum allows a large expansion of mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytotherapy*, 11: 153-162
- Prockop D.J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276:71-74
- Psaltis P.J., Paton S., See F., Arthur A., Martin S., Itescu S., Worthley S.G., Gronthos S., Zannettino A.C. 2010. Enrichment for STRO-1 expression enhances the cardiovascular paracrine activity of human bone marrow-derived mesenchymal cell populations. *Journal of Cell Physiology*, 223, 2: 530-540

- Quirici N., Soliso D., Bossalasco P, Servida F., Lumini C., Deliliers G.L. 2002. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Experimental Hematology*, 30, 7: 783-791
- Raff M. 2003. Adult stem cell plasticity: Fact or artifact? *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19: 1-22
- Rahman M. 2011. Introduction to flow cytometry. Oxford Serotec. <http://www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf> (20. jun. 2011)
- Ratajczak M.Z., Machalinski B., Wojakowski W., Ratajczak J., Kucia M. 2007. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4+ stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia*, 21, 5: 860-867
- Reyes M., Dudek A., Jahagirdar B., Koodie L., Marker P.H., Verfaillie C.M. 2002. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *Journal of Clinical Investigation*, 109, 3: 337-346
- Reyes M., Verfaillie C.M. 2001. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation od mesenchymal stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 938: 231-235
- Rastegar F., Shenaq D., Huang J., Zhang W., Zhang B.Q., He B.C., Chen L., Zuo G.W., Luo Q., Shi Q., Wagner E.R., Huang E., Gao Y., Gao J.L., Kim S.H., Zhou J.Z., Bi Y., Su Y., Zhu G., Luo J., Luo X., Qin J., Reid R.R., Luu H.H., Haydon R.C., Deng Z.L., He T.C. 2010. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World Journal of Stem Cells*, 26, 2, 4: 67-80
- Rider D.A., Nalathamby T., Nurcombe V., Cool S.M. 2007. Selection using the alpha-1 integrin (CD49a) enhances the multipotentiality of the mesenchymal stem cell population from heterogeneous bone marrow stromal cells. *Journal of Molecular Histology*, 38, 5: 449-458
- Ringden O., Uzunel M., Rasmussen I., Remberger M., Sundberg B., Loennies H., Marschall H.U., Dlugosz A., Szakos A., Hassan Z., Omazic B., Aschan J., Barkholt L., Le Blanc K. 2006. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*, 81: 1390-1397
- Ripa R.S., Haack-Sorensen M., Wang Y., Jorgensen E., Mortensen S., Bindslev L., Friis T., Kastrup J. 2007. Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) trial. *Circulation*, 116: 124-30
- Rogers J.J., Young H.E., Adkison L.R., Lucas P.A., Black A.C. Jr. 1995. Differentiation factors induce expression of muscle, fat, cartilage, and bone in a clone of mouse pluripotent mesenchymal stem cells. *The American Surgeon*, 61: 231-236

Rožman P., Strbad., Knežević M. 2007. Uporaba matičnih celic v medicini. V: Genialna prihodnost – genetika, determinizem in svoboda: zbornik prispevkov. Mednarodni posvet Biološka znanost in družba, Ljubljana, 4-5 oktober. 2007. Strguc-Krajšek S., Popit T., Vičer M. (ur.). Ljubljana, Zavod RS za šolstvo: 202-212

Rožman P., Jež M. 2011. Matična celica in napredno zdravljenje - pojmovnik, Zdravljenje s celicami, gensko zdravljenje in tkivno inženirstvo. Celje, Celjska Mohorjeva družba: 296 str.

Rubio D., Garcia S., De la Cueva T., Paz M.F., Lloyd A.C., Bernad A., Garcia-Castro J. 2007. Human mesenchymal stem cell transplataion is associated with a mesenchymal-epitelial transition. *Experimental Cell Research*, 314, 4: 694-698

Rudge J.S., Pasnikowski E.M., Mattsson K., Pan L., Yancopoulos G.D., Wiegand S.J., Lindsay R.M., Ip N.Y. 1994. Neurotrophic factor receptors and their signal transduction capabilities in rat astrocytes. *The European Journal of Neuroscience*, 6, 5: 693-705

Sabatini F., Petecchia L., Tavian M., Jodon de Villeroche V., Rossi G.A., Brouty-Boye D. 2005. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Laboratory Investigation*, 85, 8: 962-971

Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., Hazzi C., Stedeford T., Willing A., Freeman T.B., Saporta S., Janssen W., Patel N., Cooper D.R., Sanberg P.R. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental Neurology*, 164: 247-256

Sasaki M., Abe R., Fujita Y., Ando S., Inokuma D., Shimizu H. 2008. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of Immunology*, 180, 4: 2581-2587

Schneider R.K., Neuss S., Stainforth R., Laddach N., Bovi M., Knuechel R., Perez-Bouza A. 2008. Threedimensional epidermis-like growth of human mesenchymal stem cells on derma equivalents: contribution to tissue organization by adaptation of myofibroblastic phenotype and function. *Differentiation*, 76, 2: 156-167

Schrepfer S., Deuse T., Lange C., Katzenberg R., Reichenspurner H., Robbins R.C., Pelletier M.P. 2007. Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 16, 1: 105-107

Schwartz R.E., Reyes M., Koodie L., Jiang Y., Blackstad M., Lund T., Lenvik T., Johnson S., Hu W.S., Verfaillie C.M. 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *Journal of Clinical Investigation*, 109, 10: 1291-1302

- Sekiya I., Larson B.L., Smith J.R., Pochampally R., Cui J.G., Prockop D.J. 2002. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*, 20: 530-541
- Sensebe L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R. 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sanguinis*, 98: 93-107
- Shi S., Gronthos S. 2003. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18, 4: 696-704
- Shiota M., Heike T., Haruyama M., Baba S., Tsuchiya A., Fujino H., Kobayashi H., Kato T., Umeda K., Yoshimoto M., Nakahata T. 2007. Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties. *Experimental Cell Research*, 313: 1008-1023
- Simmons P.J., Torok-Storb B. 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 78: 55-65
- Sobiesiak M., Sivasubramaniyan K., Hermann C., Tan C., Orgel M., Treml S., Cerabona F., de Zwart P., Ochs U., Muller C.A., Gargett C.E., Kalbacher H., Bühring H.J. 2010. The mesenchymal stem cell antigen MSCA-1 is identical to tissue non-specific alkaline phosphatase. *Stem Cells and Development*, 19: 669-677
- Sohni A., Verfaillie C.M. 2011. Multipotent adult progenitor cells. *Best practice and Research Clinical Haematology* 24: 3-11
- Sorrentino A., Ferracin M., Castelli G., Biffoni M., Tomaselli G., Baiocchi M., Fatica A., Negrini M., Peschle C., Valtieri M. 2008. Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Experimental Hematology*, 36: 1035-1046
- Spees J.L., Olson S.D., Ylostalo J., Lynch P.J., Smith J., Perry A., Peister A., Wang M.Y., Prockop D.J. 2003. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells for bone marrow stroma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 2397-2402
- Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33: 191-926
- Stewart K., Monk P., Walsh S., Jefferiss C.M., Beresford J.N. 2003. STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell and Tissue Research*, 313: 281-290

- Tang J., Wang J., Zheng F., Kong X., Guo L., Yang J., Zhang L., Huang Y. 2010. Combination of chemokine and angiogenic factor genes and mesenchymal stem cells could enhance angiogenesis and improve cardiac function after acute myocardial infarction in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 339: 107-118
- Thomson T.M., Rettig W.J., Chesa P.G., Green S.H., Mena A.C., Old L.J. 1988. Expression of human nerve growth factor receptor on cells derived from all three germ layers. *Experimental Cell Research*, 174, 2: 533-539
- Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S., Byrne B.J., Kessler P.D. 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105, 1: 93-98
- Tondreau T., Lagneaux L., Dejeneffe M., Dolforge A., Massy M., Mortier C., Bron D. 2004. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy*, 6: 372-379
- Tondreau T., Meuleman N., Delforge A., Dejeneffe M., Leroy R., Massy M., Mortier C., Bron D., Lagneaux L. 2005. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells*, 23, 8: 1105-1112
- Tse W.T., Pendleton J.D., Beyer W.M., Egalka M.C., Guinan E.C. 2003. Suppression of allogeneic T cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 75: 389-397
- Tuli R., Seghatoleslami M.R., Tuli S., Wang M.L., Hozack W.J., Manner P.A., Denielsen K.G., Tuan R.S. 2003. A simple, high-yield methods for obtaining multipotential mesenchymal progenitor stem cells from trabecular bone. *Molecular Biology*, 23: 37-49
- Veber M. 2010. Identifikacija matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi v humani popkovnični krvi s pretočno citometrijo, diplomsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 57 str.
- Verfaillie C.M. 2005a. Stem cell plasticity. *Hematology*, 10, 1: 293-296
- Verfaillie C.M. 2005b. Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis Foundation Symposium*, 265: 55-61
- Vroemen M., Weidner N. 2003. Purification of Schwann cells by selection of p75 low affinity nerve growth factor receptor expressing cells from adult peripheral nerve. *Journal of Neuroscience Methods*, 124: 135-143
- Wagner W., Ho A.D., 2007. Mesenchymal stem cell preparations – Comparing apples and oranges. *Stem Cell Review*, 3: 239-248

- Wakitani S., Saito T., Caplan A.I. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle and Nerve*, 18: 1417-1426
- Wang Y., Huso D.L., Harrington J., Kellner J., Jeong D.K., Turney J., McNiece I.K. 2005. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cyotherapy*, 7, 6: 509-519
- Wexler S.S., Donaldson C., Denning-Kendall P., Rice C., Bradley B., Hows J.M. 2003. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal of Hematology*, 121: 368-374
- Williams J.T., Southerland S.S., Souza J., Calcutt A.F., Cartledge R.G. 1999. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *The American Surgeon*, 65: 22-26
- Willing A.E., Lixian J., Milliken M., Poulos S., Zigova T., Song S., Hart C., Sanchez-Ramos J., Sanberg P.R. 2003. Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *Journal of Neuroscience Research*, 73: 296-307
- Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J., Black I.B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 61: 364-370
- Young H.E., Ceballos E.M., Smith J.C., Mancini M.L., Wright R.P., Ragan B.L., Bushell I., Lucas P.A. 1993. Pluripotent mesenchymal stem cells reside within avian connective tissue matrices. *In Vitro Cellular and Development Biology*, 29B: 723-736
- Zannettino A.C., Paton S., Kortesidis A., Khor F., Itescu S., Gronthos S. 2007. Human multipotential mesenchymal/stromal stem cells are derived from a discrete subpopulation of STRO-1bright/CD34/CD45(-)/glycophorin-A-bone marrow cells. *Haematologica*, 92, 12: 1707-1708
- Zhang H., Fazel S., Tian H., Mickle D.A., Weisel R.D., Fujii T., Li R.K. 2005. Increasing donor age adversely impacts beneficial effects of bone marrow but not smooth muscle myocardial cell therapy. *American Journal Physiology*, 289: 2089-2096
- Zhang M., Mal N., Kiedrowski M., Chacko M., Askari A.T., Popovic Z.B., Koc O.N., Penn M.S. 2007. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *The FASEB Journal*, 21, 12: 3197-3207
- Zipori D. 2005. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells*, 23, 6: 719-726
- Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Behaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7: 211-228

ZAHVALA

Mentorju, doc. dr. Miomirju Kneževiču se iskreno zahvaljujem, da me je tekom študija navdušil za področje medicinske biotehnologije. Zahvaljujem se mu tudi za korekten pregled diplomskega dela in vse izrečene spodbudne besede.

Posebej se zahvaljujem somentorju izr. prof. dr. Primožu Rožmanu, ki mi je omogočil delo v svoji raziskovalni skupini ter mi izkazal zaupanje in podporo pri opravljanju raziskovalnega dela. Zahvaljujem se mu tudi za izjemno korekten in hiter pregled diplomskega dela in nasvete v povezavi z njim.

Zahvala gre tudi recenzentki doc. dr. Tanji Kunej za hiter in temeljit pregled diplomskega dela.

Zahvaljujem se dr. Lenartu Girandomu za vse nasvete pri gojenju celic in izdelavi rastnih krivulj. Zahvaljujem se mu tudi, ker si je bil pripravljen vzeti čas za diskusijo, ko je bilo to potrebno.

Posebej se zahvaljujem dr. Elviri Maličev, ki si je bila vedno pripravljena vzeti čas za diskusijo ter reševanje problemov glede eksperimentalnega dela, predvsem pri poskusih povezanih s pretočno citometrijo. Zahvaljujem se ji tudi za vse nasvete glede diplomskega dela in vseh ostale stvari na sploh.

Zahvaljujem se Mojci Jež, ki me je uvedla v delo v celičnem laboratoriju in Matiji Vebru, ki me je uvedel v delo s pretočnim citometrom. Zahvaljujem se jima za vse izkušnje, ki sem jih z njima pridobil pri eksperimentalnem delu in reševanju problemov. Zahvaljujem se jima tudi za vse nasvete in spodbude pri opravljanju diplomskega dela.

Za hitro lektoriranje in nasvete se zahvaljujem ga. Luciji Čakš.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, ki so mi bili pripravljeni pomagati pri marsikaterem problemu in so znali pričarati prijetno delovno vzdušje.

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

Iskreno se zahvaljujem tudi vsem ostalim, ki ste mi kakor koli pomagali pri nastajanju tega dela.

Prav posebno zahvalo pa namenjam svojim staršem, ki so mi stali ob strani in mi nudili toplo zavetje doma. Hvala tudi za moralno in finančno podporo, s katero ste mi omogočili študij in mi tako pomagali na poti do zastavljenih ciljev. Iskrena hvala!

PRILOGE

Priloga A:

Izjava o poučenosti in pisna privolitev v postopek

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

Zavod RS za transfuzijsko medicino
Šlajmerjeva 6
SI-1000 Ljubljana

IZJAVA O POUČENOSTI IN PISNA PRIVOLITEV V POSTOPEK

Podpisani/-a

rojen/-a

sem bila seznanjen/-a in sem razumel/-a namen raziskave in 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«.

Dr. 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 omogočeno popolno 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:

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Gašper KLANČAR

**PRIMERJAVA METOD IZOLACIJE
MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IZ
HUMANEGA KOSTNEGA MOZGA Z
IMUNOMAGNETNO SELEKCIJO IN
ADHERENCO NA PLASTIKO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011