

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ana KOREN

**KARAKTERIZACIJA PREDNIŠKIH CELIC,
PRIDOBLEJENIH IZ HUMANIH EMBRIONALNIH
MATIČNIH CELIC**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ana KOREN

**KARAKTERIZACIJA PREDNIŠKIH CELIC, PRIDOBLEJENIH IZ
HUMANIH EMBRIONALNIH MATIČNIH CELIC**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CHARACTERIZATION OF PROGENITOR CELLS DERIVED FROM
HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je nastalo v okviru študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v laboratoriju za matične celice in tkivno inženirstvo (»Laboratory for Stem Cells and Tissue Engineering«) na Univerzi Columbia (»Columbia University«) v New Yorku, ZDA, v sodelovanju z Zavodom RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 12. 4. 2010 za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miomirja Kneževića, za somentorico dr. Darjo Marolt in za recenzenta izr. prof. dr. Marka Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: doc. dr. Miomir KNEŽEVIC
Zavod RS za transfuzijsko medicino

Član: dr. Darja MAROLT
Columbia University, Laboratory for Stem Cells and Tissue Engineering,
New York, ZDA

Član: izr. prof. dr. Marko KREFT
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko
fiziologijo

Datum zagovora: 20. 8. 2010

Izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Ana KOREN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 606: 602.9: 611.018 (043.2)
KG	celična biologija/ tkivno inženirstvo/ matične celice/ predniške celice/ diferenciacija/ multilinijski potencial
AV	KOREN, Ana
SA	KNEŽEVIĆ, Miomir (mentor)/ MAROLT, Darja (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2010
IN	KARAKTERIZACIJA PREDNIŠKIH CELIC, PRIDOBLJENIH IZ HUMANIH EMBRIONALNIH MATIČNIH CELIC
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XV, 75 str., 15 pregl., 43 sl., 110 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Humane embrionalne matične celice (hESC) predstavljajo neomejen vir celic za uporabo v regenerativni medicini. Praktična uporaba hESC temelji na razvoju enostavnih in učinkovitih protokolov za usmerjeno diferenciacijo celic. Pridobljena populacija mora biti uniformna, enostavna za gojenje, mora preživeti transplantacijo <i>in vivo</i> in tvoriti funkcionalno tkivo brez tveganja nastanka tumorjev. V raziskovalnem delu te diplomske naloge smo celostno okarakterizirali predniške celice, ki so bile pridobljene iz hESC (hESC-P). Preverjali smo njihovo morfologijo, sposobnost rasti v kulturi ter njihov diferenciacijski potencial za tvorbo nekaterih mezenhimskega tkiva (kost, hrustanec ter maščobno tkivo). Rezultate smo primerjali z dvema populacijama mezenhimskega matičnega celica iz kostnega mozga kot pozitivno kontrolo in primarnimi človeškimi fibroblasti kot negativno kontrolo. Celice smo diferencirali v monoslojih in v kulturah peletov štiri tedne ter jih ovrednotili z biokemijskimi, histološkimi in molekularno biološkimi analizami. V nadaljevanju raziskave smo celice hESC-P nasadili na nosilce iz decellularizirane goveje kosti ter ugotovljali učinkovitost nasajevanja in viabilnost celic v osteogenem gojišču. Ugotovili smo, da so bile hESC-P morfološko podobne odraslim mezenhimskim matičnim celicam ter so sposobne dolgotrajne rasti v kulturi. Diferenciacijski testi so pokazali, da so se hESC-P sposobne diferencirati v zrel osteoblastni fenotip ter tvoriti mineraliziran ekstracelularni matriks. V nasprotju s kontrolnimi kulturami so hESC-P izražale omejen potencial za hondrogeno in adipogeno diferenciacijo. Po nasaditvi na nosilec iz decellularizirane kosti so se hESC-P nanj uspešno pritrdile, ostale žive ter se v treh dneh začele podvojevati. Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da so hESC-P potencialno uporabne v tkivnem inženirstvu kosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 606: 602.9: 611.018 (043.2)
CX cell biology/ tissue engineering/ stem cells/ progenitor cells/ differentiation / multilineage potential
AU KOREN, Ana
AA KNEŽEVIĆ, Miomir (supervisor)/ MAROLT, Darja (co-supervisor)
PP 1000-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY 2010
TI CHARACTERIZATION OF PROGENITOR CELLS DERIVED FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XV, 75 p., 15 tab., 43 fig., 110 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Human embryonic stem cells (hESC) represent an unlimited and universal stem cell source for applications in regenerative medicine. Practical use of hESC depends on development of simple and efficient protocols for their directed differentiation. Generated cell populations should be uniform, easy to culture and should survive *in vivo* transplantation and produce functional tissue without the risk of tumor formation. In our study, we have characterized progenitor cells derived from hESC (hESC-P). We monitored hESC-P morphology in culture, tested their potential for growth and ability to differentiate into several mesenchymal tissues (bone, cartilage and fat tissue). We compared our results with two populations of bone marrow-derived mesenchymal stem cells as a positive control and primary human fibroblasts, which served as a negative control of differentiation. Cells were differentiated in monolayer and pellet cultures for four weeks, and evaluated with biochemical, histological and molecular assays. Subsequently, we have seeded hESC-P cells on decellularized bovine bone scaffolds and determined the seeding efficiency and cell viability in osteogenic medium. Our results show that hESC-P resemble morphologically adult mesenchymal stem cells and posses potential for prolonged growth in culture. Differentiation assays indicated that hESC-P can differentiate into mature osteoblast phenotype and form mineralized extracellular matrix. In contrast to control cultures, hESC-P expressed limited potential for chondrogenic and adipogenic differentiation. After seeding on decellularized bone scaffolds, hESC-P remained viable, successfully attached and started proliferating after three days. Based on the results of our studies, we can conclude that hESC-P could be usefull in the field of bone tissue engineering.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	XI
Slovarček	XIII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	3
1.2 NAMEN DELA	4
1.3 HIPOTEZA	5
2 PREGLED OBJAV	6
2.1 ZGODNJI RAZVOJ ČLOVEKA IN EMBRIONALNE MATIČNE CELICE	6
2.1.1 Oploditev, brazdanje in gastrulacija	6
2.2 EMBRIONALNE MATIČNE CELICE (ESC)	8
2.2.1 Pridobivanje in gojenje	8
2.2.2 Karakterizacija in fenotip hESC	9
2.3 DIFERENCIACIJA ESC Z UPORABO RASTNIH FAKTORJEV	10
2.4 MEZENHIMSKE CELICE, PRIDOBLJENE IZ hESC	11
2.4.1 Pristopi za usmerjeno diferenciacijo hESC v mezenhimske celice	12
2.4.2 Lastnosti pridobljenih celičnih populacij	12
2.5 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE (MSC)	14
2.5.1 Identifikacija in tkivni viri MSC	14
2.5.2 Izolacija in <i>in vitro</i> kultivacija MSC	14
2.5.3 Fenotip	15
2.5.4 Sposobnost samoobnavljanja	16
2.5.5 Multilinijski potencial	16
2.5.5.1 Potek osteogene diferenciacije MSC	17
2.5.5.2 Potek hondrogene diferenciacije MSC	19
2.5.5.3 Potek adipogene diferenciacije MSC	19
2.5.5.4 Uporaba celičnih nosilcev pri diferenciaciji celic	20
2.6 PRIMERJAVA EMBRIONALNIH IN MATIČNIH CELIC ODRASLEGA	21
3 MATERIJAL IN METODE	22
3.1 MATERIJAL	22
3.1.1 Celice	22
3.1.2 Kemikalije	22
3.1.3 Aparature in plastični pripomočki	24
3.1.4 Gojišča in ostale raztopine	25
3.1.5 Reagenti in pripomočki za PCR v realnem času	25
3.2 METODE	26
3.2.1 Metode dela s celičnimi kulturami	26
3.2.1.1 Odmrzovanje celic	26

3.2.1.2	Gojenje in presaditev celic	26
3.2.1.3	Zamrzovanje celic	27
3.2.2	Namnoževanje celic in ugotavljanje dinamike rasti hESC-P	27
3.2.3	Diferenciacija celic v monoslojih	27
3.2.4	Priprava in diferenciacija celic v kulturah peletov	28
3.2.5	Metode za določanje števila celic	29
3.2.5.1	Štetje s tripanskim modrilm	29
3.2.5.2	Določanje koncentracije DNA v vzorcih	29
3.2.6	Citokemični test za ugotavljanje aktivnosti encima alkalna fosfataza	30
3.2.7	Merjenje celokupne koncentracije kalcija	30
3.2.8	Barvanje Von Kossa	31
3.2.9	Barvanje z Oil Red O	32
3.2.10	Določanje koncentracije glikozaminoglikanov	32
3.2.11	Izolacija RNA s Trizolom	33
3.2.12	Merjenje koncentracije RNA	34
3.2.13	Razgradnja DNA	34
3.2.14	Reverzna transkripcija	35
3.2.15	PCR v realnem času	36
3.2.16	Histološke analize	37
3.2.16.1	Fiksacija, vpenjanje peletov v histogel ter priprava histoloških rezin	37
3.2.16.2	Barvanje Von Kossa histoloških rezin	37
3.2.16.3	Barvanje histoloških rezin z alcianskim modrilm	37
3.2.17	Nasajevanje hESC-P na nosilce iz decellularizirane kosti	38
3.2.17.1	Priprava celičnih nosilcev iz decellularizirane goveje kosti	38
3.2.17.2	Nasajevanje hESC-P na nosilce	39
3.2.17.3	Merjenje viabilnosti celic	39
3.2.18	Statistične analize	40
4	REZULTATI	41
4.1	DINAMIKA RASTI IN MORFOLOGIJA hESC-P	41
4.2	UGOTAVLJANJE DIFERENCIACIJSKEGA POTENCIALA hESC-P	45
4.2.1	Diferenciacija celic v monoslojih	45
4.2.1.1	Preverjanje osteogenega potenciala	45
4.2.1.1.1	Aktivnost alkalne fosfataze	45
4.2.1.1.2	Barvanje Von Kossa	47
4.2.1.1.3	Izražanje osteogenega označevalca Cbfa-1 (Runx-2)	49
4.2.1.2	Preverjanje adipogenega potenciala	49
4.2.1.2.1	Barvanje Oil Red O	49
4.2.1.2.2	Izražanje adipogenega označevalca PPAR γ	51
4.2.2	Diferenciacija celic v peletih	51
4.2.2.1	Morfologija in vsebnost DNA v peletih	51
4.2.2.2	Preverjanje osteogenega potenciala	53
4.2.2.2.1	Barvanje Von Kossa	53
4.2.2.2.2	Vsebnost kalcija v peletih	53
4.2.2.3	Preverjanje hondrogenega potenciala	54
4.2.2.3.1	Barvanje z alcianskim modrilm	54
4.2.2.3.2	Vsebnost glikozaminoglikanov v peletih	55

4.3	NASADITEV IN PREŽIVETJE hESC-P NA NOSILCIH IZ DECELULARIZIRANE GOVEJE KOSTI	55
4.3.1	Razporeditev in živost celic hESC-P v konstruktih	55
4.3.2	Učinkovitost nasaditve celic hESC-P na nosilec (angl. Seeding Efficiency)	57
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	58
6	POVZETEK	64
7	VIRI	66
7.1	CITIRANI VIRI	66
7.2	DRUGI VIRI	
7.2	ZAHVALA	75

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Glavni tipi matičnih celic	2
Preglednica 2: Somatske plasti in njihovi derivati	8
Preglednica 3: Različni načini indukcije diferenciacije pri hESC in metode za karakterizacijo pridobljene celične populacije	13
Preglednica 4: Izražanje površinskih proteinskih antigenov pri MSC.....	15
Preglednica 5: Preverjanje diferencijskega potenciala matičnih celic iz kostnega mozga.....	17
Preglednica 6: Različni tipi nosilcev, ki se uporabljajo v tkivnem inženirstvu kosti	20
Preglednica 7: Glavne razlike med matičnimi celicami iz odraslih tkiv ter embrionalnimi matičnimi celicami.....	21
Preglednica 8: Seznam kemikalij, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu	22
Preglednica 9: Seznam glavnih aparatur in plastičnih pripomočkov, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu	24
Preglednica 10: Seznam in sestava uporabljenih gojišč pri raziskovalnemu delu	25
Preglednica 11: Uporabljene raztopine pri raziskovalnem delu.....	25
Preglednica 12: Seznam reagentov in pripomočkov za merjenje izražanja genov z metodo PCR v realnem času	25
Preglednica 13: Priprava mešanice za denaturacijo RNA.....	35
Preglednica 14: Priprava mešanice za sintezo cDNA.....	36
Preglednica 15: Izmerjene količine DNA za izračun učinkovitosti sejanja hESC-P na nosilec	57

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Tkvno inženirski pristop za gojenje kostnega tkiva <i>in vitro</i>	3
Slika 2: Shema poteka poskusov	5
Slika 3: Razvoj človeškega zarodka od oploditve do implantacije	6
Slika 4: Različne predimplantacijske stopnje zarodka.....	7
Slika 5: Usmerjena gibanja celic pri gastrulaciji	7
Slika 6: hESC v kulturi	9
Slika 7: Model regulacije diferenciacije embrionalnih matičnih celic v kulturi	11
Slika 8: Mezenhimske matične celice iz kostnega mozga v kulturi	15
Slika 9: Diferenciacija mezenhimskih matičnih celic	16
Slika 10: Koraki v osteogeni diferenciaciji v celični kulturi skozi spremembe izražanja nekaterih osteogenih označevalcev.....	19
Slika 11: Razporeditev na plošči za poskus diferenciacije celic v monoslojih	28
Slika 12: Povzetek postopka reverzne transkripcije	35
Slika 13: Dinamika rasti hESC-P skozi podaljšano gojenje (40 dni)	41
Slika 14: hESC-P, 4. pasaža, 30 % konfluentnost	42
Slika 15: hESC-P, 4. pasaža, 90 % konfluentnost	42
Slika 16: hESC-P, 5. pasaža, 20 % konfluentnost	42
Slika 17: hESC-P, 5. pasaža, 90 % konfluentnost	42
Slika 18: hESC-P, 6. pasaža, 40 % konfluentnost	42
Slika 19: hESC-P, 6. pasaža, 100 % konfluentnost	42
Slika 20: hESC-P, 7. pasaža, 90 % konfluentnost	43
Slika 21: hESC-P, 8. pasaža, 100 % konfluentnost	43
Slika 22: hESC-P, 9. pasaža, 30 % konfluentnost	43
Slika 23: hESC-P, 9. pasaža, 90 % konfluentnost	43
Slika 24: hESC-P, 10. pasaža, 80 % konfluentnost	43
Slika 25: hESC-P, 10. pasaža, 80 % konfluentnost	43
Slika 26: hESC-P, 11. pasaža, 30 % konfluentnost	44
Slika 27: hESC-P, 11. pasaža, 30 % konfluentnost	44
Slika 28: Primerjava morfologije hESC-P in BMSC.....	44
Slika 29: NHF v kulturi, 4, pasaža, 90 % konfluentnost.....	44
Slika 30: Naraščanje alkalne fosfataze v tednih 1-4 pri različnih celičnih tipih	46

Slika 31: Celično barvanje Von Kossa v tednih 1-4 pri različnih celičnih tipih	48
Slika 32: Izražanje osteogenega označevalca Cbfa-1 v osteogenem in kontrolnem gojišču.....	49
Slika 33: Celično barvanje Oil Red O v tednih 1-4 pri različnih celičnih tipih	50
Slika 34: Izražanje adipogenega označevalca PPAR γ v adipogenem in kontrolnem gojišču.....	51
Slika 35: Histološke rezine peletov, obarvane s hematoksilinskim barvilom.....	52
Slika 36: Primerjava števila celic v peletih po 4 tednih kultivacije v osteogenem, kontrolnem in hondrogenem gojišču	52
Slika 37: Barvanje Von Kossa histoloških rezin iz peletov po 4-tedenski kultivaciji v osteogenem in hondrogenem gojišču	53
Slika 38: Izmerjene količine kalcija, normalizirane na količino DNA v kontrolnem, osteogenem in hondrogenem gojišču	54
Slika 39: Histološke rezine iz peletov, obarvane z alcianskim modrilom	54
Slika 40: Izmerjene vrednosti GAG, normalizirane na količino DNA, v kontrolnem, osteogenem in hondrogenem gojišču pri različnih celičnih tipih	55
Slika 41: Razporeditev celic v notranjosti nosilca.....	56
Slika 42: Ocena živosti celic 1 in 3 dni po nasaditvi na nosilec	56
Slika 43: Učinkovitost nasaditve hESC-P na nosilec	57

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2D	dvodimenzionalen
3D	tridimenzionalen
AA-2-P	aksorbinska kislina 2-fosfat
AB	alciansko modrilo (angl. Alcian Blue)
AP	encim alkalna fosfataza (angl. Alkaline Phosphatase)
aP2	adipocitni maščobno kislinski vezni protein 2 (angl. Adipocyte Fatty Acid Binding Protein 2)
ASC	matična celica iz maščobnega tkiva (angl. Adipose derived Stem Cell)
BMP	protein kostne morfogeneze (angl. Bone Morphogenetic Protein)
BMSC	matična celica iz kostnega mozga (angl. Bone Marrow-derived Stem Cell)
BSP	kostni sialoprotein (angl. Bone SialoProtein)
Cbfa-1/Runx-2	angl. core-binding factor α -1/runt-related transcription factor 2
cDNA	komplementarna DNA
CFU-F	fibroblast, ki tvori kolonije (angl. Colony Forming Units – Fibroblast)
c-Myc	gen, ki kodira protein iz družine Myc transkripcijskih dejavnikov
C _T	pražni cikel (angl. Cycle Threshold)
Dex	deksametazon
DMEM	Dulbeccov modificiran medij (angl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMM	1,9-dimetil-metilen modro
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic Acid)
EB	embrioidno telesce (angl. Embrioid Body)
ECM	ekstracelularni matriks (angl. Extracellular matrix)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
ELISA	encimskoimunski test (angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
EMT	epitelno-mezodermalna tranzicija
ESC	embrionalna matična celica (angl. Embryonic Stem Cell, ESC)
FBS	fetalni telečji serum (angl. Fetal Bovine Serum)
FGF	fibroblastni rastni faktor (angl. Fibroblast Growth Factor)
Flk-1	fetalna jetrna kinaza (angl. Fetal Liver Kinase)
Foxa-2	angl. Forkhead box a-2
FTIR	Fourierjeva transformacijska infrardeča spektroskopija (angl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
GAG	glikozaminoglikani (angl. Gycosaminoglycans)
GAPDH	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (angl. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
h	humani (pridevnik)
HA	hidroksiapatit
hESC-P	predniška celica, pridobljena iz humane embrionalne matične celice (angl. Human Embryonic Stem Cell-derived Progenitor cell)

IBMX	3-izobutil-1-metilksantin
ICM	notranja celična masa (angl. Inner Cell Mass)
IGF	inzulinu podoben rastni faktor (angl. Insulin-like Growth Factor)
iPS celica	inducirana pluripotentna matična celica
ITS	inzulin-transferin-selen
IVF	<i>in vitro</i> oploditev (angl. <i>In Vitro</i> Fertilisation)
Klf	angl. Krüppel like factor
KOL-I	kolagen tipa I
KOL-II	kolagen tipa II
LPL	lipoproteinska lipaza
m	mišji (pridevnik)
mRNA	informacijska RNA (angl. messenger RNA)
MSC	mezenhimska matična celica (angl. Mesenchymal Stem Cell)
NHF	normalni humani fibroblasti
OCN	osteokalcin (angl. Osteocalcin)
Oct-4	oktamer-4
OPN	osteopontin
OR	Oil Red O
PBS	fosfatni pufer (angl. Phosphate Buffered Saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
Pen-Strep	penicilin-streptomicin
PLA	polimlečna kislina (angl. Polylactic Acid)
PLGA	poli(mlečna-ko-glikolna) kislina (angl. Poly (Lactic-co-Glycolic Acid))
POL-2	polimeraza tipa II
PP	primitivna proga
PPAR γ	s peroksisomsko proliferacijo aktiviran receptor- γ (angl. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ)
PTH/PTHrP-R	s paratiroidnim hormonom povezan peptidni receptor
qPCR	kvantitativni PCR
RNA	ribonukleinska kislina (angl. Ribonucleic Acid)
ROCK	angl. Rho-associated coiled-coil kinase
RT	reverzna transkripcija
RT-PCR	reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo
SCID	huda kombinirana imunska pomanjkljivost (angl. Severe Combined Immunodeficiency Disease)
Sox	angl. Sex Determining Region Y-box
SSEA	angl. Stage-Specific Embryonic antigen
STO	mišja fibroblastna celična linija
TGF- β	transformirajoči rastni faktor β (angl. Transforming Growth Factor β)
VEGF	rastni faktor žilnega endotelija (angl. Vascular Endothelial Growth Factor)
VK	Von Kossa
Wnt	»Wingless« protein
α -MEM	angl. α -Minimal Essential Medium
β -GP	β -glicerofosfat

SLOVARČEK

POJEM	RAZLAGA
Adherenten (celice)*	Celice, ki se pri gojenju pritrdijo na podlago oz. dno gojilne posode.
Adipocit*	Maščobna celica. Specializirana celica za hranjenje energije v obliki mašcobe.
Alogenski*	Tkivo, celice ali organ drugega osebka iste biološke vrste, ki pa je genetsko različen in zato tudi imunsko neskladen.
Avtologen*	Tkivo, celice ali organ, ki jih presadimo istemu osebku, ki jih je daroval.
Biomaterial*	Naraven ali sintetični material (npr. kovina ali polimer), ki je primeren za uporabo skupaj z živim tkivom, posebno kot del medicinskega pripomočka (npr. umeten sklep).
Dediferenciacija*	Proces, v katerem se diferencirane somatske celice vrnejo v manj diferencirano, multipotentno stanje.
Diferenciacija*	Proces, v katerem manj specializirana celica pridobi lastnosti bolj specializiranih celic.
Ekstracelularni matriks (ECM)*	Mikrookolje med celicami, ki jim nudi oporo, orientacijo in omogoča medcelične interakcije. ECM kosti sestavlja organska in anorganska komponenta. Organska komponenta je 90 % kolagen tipa I, glavna anorganska komponenta pa je kalcijev fosfat v obliki hidroksiapatitnih kristalov.
Embrioidno telesce*	Okrogel skupek celic, ki ga dobimo, če gojimo embrionalne matične celice v suspenzijski kulturi. Embrioidna telesca vsebujejo celice vseh treh embrionalnih (zarodnih) plasti in se uporabljajo za študije <i>in vitro</i> diferenciacije ESC. Embrioidna telesca ne nastajajo pri normalnem razvoju, ampak se razvijejo samo v razmerah <i>in vitro</i> .
Embrionalne matične celice*	Pluripotentne matične celice, ki jih najdemo v zgodnjem zarodku – blastocisti (~5. dan) ter jih lahko imunokorirško ali mehansko izoliramo iz notranje celične mase ter vzpostavimo celično limijo.
Fibroblast*	Celica vezivnega tkiva sploščene podolgovate oblike s citoplazemskimi izrastki in ovalnim jedrom. So najbolj pogost celični tip v vezivnem tkivu. Fibroblasti sintetizirajo ekstracelularni matriks iz kolagenskih vlaken in imajo pomembno vlogo pri celjenju ran.
Hišni gen*	Konstitutivni gen, ki se prepisuje v relativno konstantnih nivojih v mnogih ali vseh znanih pogojih. Njegovi produkti so pomembni za vzdrževanje celice. Predvideva se, da eksperimentalni pogoji ne vplivajo na njegovo izražanje. Primeri hišnih genov so aktin, GAPDH in ubikvitin.
Hondrocyt*	Specializirana celica hrustančnega tkiva. Hondrocyti so edine celice v hrustancu. Proizvajajo in vzdržujejo hrustančni matriks, ki je sestavljen iz kolagena in proteoglikanov.

Konfluentnost*	Preraščenost dna gojilne posodice s celicami. Če so celice konfluentne, pomeni, da so popolnoma prerasle dno posode.
Mezenhimska matična celica*	Multipotentna matična celica, ki se lahko diferencira v celice kosti, hrustanca, mišic in maščevja. Glavni vir je stromalna frakcija kostnega mozga, nahaja pa se tudi v maščobnem in vezivnem tkivu.
Multipotentnost*	Sposobnost diferenciacije celic v nekatere celične tipe znotraj svoje zarodne plasti. Primer so krvotvorne matične celice.
Osteoblast	Razvojna stopnja kostne celice. Je postmitotska celica kuboidne oblike z močno alkalno fosfatazno aktivnostjo in sposobnostjo tvorbe mineraliziranega matriksa (Aubin in sod., 1998).
Osteocit	Najvišja razvojna stopnja kostne celice. Osteocit je manjši kot osteoblast, postmitotski, izgubi nekatere citoplazemske organele in je relativno metabolno neaktivnen. Značilna je zmanjšana proizvodnja ekstracelularnega matriksa ter alkalno fosfatazna aktivnost v primerjavi z osteoblasti (Aubin in sod., 1998).
Pasaža*	Presaditev celic v celični kulturi, po navadi presaditev opravimo, ko celice v kulturi popolnoma preraščajo dno gojitevne posode (t. i. konfluentno stanje).
Pelet	Kompaktni celični skupek, ki ni pritrjen na plastiko. Sestavlja ga približno 300 000 celic. Uporablja se za <i>in vitro</i> študije vpliva tridimenzionalnega okolja in medceličnih interakcij na diferenciacijo matičnih celic (Mackay in sod., 1998).
Pluripotentnost*	Sposobnost diferenciacije celic v vse tri zarodne plasti (endoderm, ektoderm, mezoderm), ne pa v trofoblast. Primer so embrionalne matične celice.
Predniška celica*	Potomka matične celice v direktni liniji.
Predniška celica, pridobljena iz embrionalne matične celice	Predniška celica, ki je bila pridobljena v postopku <i>in vitro</i> diferenciacije embrionalnih matičnih celic. Predniška celica je potomka matične celice. Podobno kot matična celica ima sposobnost diferenciacije v specifični celični tip. Za razliko od matične celice je bolj specifična, njen diferenciacijski potencial je zmanjšan. Je uni- ali oligopotentna.
Regenerativna medicina*	Veja medicine, ki se ukvarja z obnovo fizioloških funkcij organov in tkiv in pri tem uporablja postopke naprednega zdravljenja: gensko terapijo, terapijo s celicami in tkivno inženirstvo. Pri celičnih terapijah je poudarek na uporabi matičnih in predniških celic.
SCID*	Sindrom hude kombinirane imunske pomajkljivosti ali SCID (Severe Combined Immunodeficiency) je bolezen, ki nastane zaradi nedelujočih T in B-limfocitov. Transgene SCID miške ne zavračajo tujih celic, zato se lahko med drugim uporabljajo za testiranje pluripotentnosti embrionalnih matičnih celic človeka.
Teratom*	Tumor, sestavljen iz skupka različnih tipov tkiva. Vsebuje celice vseh treh embrionalnih plasti (ektoderm, mezoderm, endoderm). Če pluripotentne matične celice vbrizgamo v SCID miške, se razvijejo v teratom, kar uporabljamo kot bistveni <i>in vivo</i> dokaz njihove

	pluripotentnosti.
Tkivno inženirstvo*	Interdisciplinarno področje, ki uporablja celice, biokemične dejavnike, sintetične nadomestke in inženirske metode za ustvarjanje umetnih organov in tkiv, ki se nato uporabijo v regenerativni medicini za menjavo ali izboljšanje funkcije poškodovanega organa ali tkiva.
Transdeterminacija*	Proces, pri katerem predniške matične celice ene usmeritve nenadoma spremenijo v celice druge predniške usmeritve, npr. iz mezodermalnih nastanejo ektodermalne prednice. Pojem je privzet iz embriologije vinske mušice, pri kateri so pod določenimi pogoji opazovali preobrazbenog v krila in obratno.
Transdiferenciacija*	Proces, pri katerem se tkivne matične celice iz enega tkiva odraslega spremenijo (oz. diferencirajo) v specializirane celice drugega tkiva.
Unipotentnost*	Sposobnost diferenciacije celic v samo en celični tip.
Zona pelucida*	Glikoproteinska ovojnica, ki obdaja zarodek v predimplantacijski fazи.

*Citirano po Rožman in Jež (2009)

1 UVOD

Človeško telo sestavlja 10 do 100 biljonov celic. Kljub osupljivi kompleksnosti pa je regenerativna sposobnost človeka majhna v primerjavi z dvoživkami, ki lahko nadomestijo izgubljeni ud že v 70 dneh. Obnova uda pri močeradu poteka z dediferenciacijo celic, ki se nato namnožijo in specializirajo v izgubljeni del telesa. Regenerativna sposobnost človeškega telesa je omejena na določena tkiva, pogosto pa je posledica poškodbe zmanjšana funkcija ali celo popolna odpoved organa. Pri višjih vretenčarjih je sposobnost regeneracije celih organov zamenjala bolj precizna zmožnost celjenja ran. Večina obnovitvenih procesov pri sesalcih je neodvisna od dediferenciacije in je posledica aktivacije že obstoječih matičnih in predniških celic.

Matične celice so grobo definirane kot celice, ki imajo sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije v različne specializirane celične tipe. Način podvojevanja matične celice je lahko simetričen ali nesimetričen. V prvem primeru sta obe hčerinski celici enaki materinski, na tak način matične celice med razvojem povečujejo svoje število. Rezultat nesimetrične delitve pa sta dve neenaki celici, ena je identična materinski, druga pa je bolj diferencirana in postopoma preide v serijo diferencijskih korakov. Na ta način matične celice ohranjajo svoje število, hkrati pa s proizvodnjo bolj specializiranih celičnih tipov regenerirajo človeško telo.

Naslednja lastnost matičnih celic je njihova plastičnost. Plastičnost pomeni sposobnost diferenciacije v druge celične tipe, kot so tkiva, v katerih se nahajajo. Mehanizem plastičnosti ni popolnoma pojasnjen in je najverjetneje sestavljen iz dediferenciacije, transdiferenciacije, transdeterminacije ter morda celo celične fuzije med odraslimi in matičnimi celicami. Dediferenciacija je proces razvoja odrasle ali linjsko usmerjene celice v bolj primitivno obliko. Transdeterminacija je preskok v drugo predniško celično linijo. Transdiferenciacija je sposobnost, ki omogoči diferencirani celici, da pridobi fenotipske značilnosti druge diferencirane celice.

Po sposobnosti diferenciacije lahko matične celice razdelimo na toti-, pluri-, multi- in unipotentne. Zigota je totipotentna celica, ki se je edina sposobna razviti v vse tipe človeških celic, vključno s spolnimi celicami in izvenembrionalnimi tkivi. Pluripotentne matične celice so se sposobne diferencirati v vse tri zarodne plasti (mezoderm, ektoderm in endoderm), ne pa v trofoblast, to je v del blastociste, ki se vgnezdi v steno maternice in se kasneje razvije v posteljico. Primer pluripotentnih celic so embrionalne matične celice (angl. Embryonic Stem Cells, ESC). Multipotentne matične celice so sposobne diferenciacije v nekatere celične vrste znotraj svoje zarodne plasti. Takšne so krvotvorne matične celice. Unipotentne matične celice pa so se sposobne razviti le v eno celično vrsto. Imenujemo jih tudi celice prednice. Od ostalih celic v telesu jih razlikuje sposobnost samoobnavljanja.

Glede na njihov izvor lahko matične celice razdelimo v embrionalne matične celice in matične celice odraslega. ESC izhajajo iz notranje celične mase blastociste, predimplantacijske stopnje zarodka, ki vsebuje 50-150 celic (Thomson, 1998). So pluripotentne, pridobivanje pa je etično sporno, saj pri njihovi izolaciji večinoma pride do

uničenja zarodka. Vir ESC so večinoma zarodki, ki so nastali v postopkih umetne oploditve in so presežki ali pa slabše kakovosti, zato bi bili v nasprotnem primeru zavrnjeni.

Matične celice odraslega se nahajajo v nekaterih tkivih odraslega. Najbolj preiskovane so matične celice iz kostnega mozga (angl. Bone Marrow Stem Cell, BMSC) (Friedenstein in sod., 1966; Lewis in Trobaugh, 1964), maščobnega tkiva (Zuk in sod., 2001) in popkovnične krvi (Broxmeyer in sod., 1989). V svojem razvojnem potencialu so matične celice odraslega bolj omejene in so navadno multi- ali unipotentne. Pridobivanje ni etično sporno, težavo pa predstavlja težka izolacija iz tkiv ter omejena količina celic, ki jih lahko pridobimo. Matične celice iz kostnega mozga in popkovnične krvi se že dalj časa uporabljajo za zdravljenje različnih, predvsem krvnih bolezni, pri katerih prednjači uporaba celic za zdravljenje nekaterih tipov levkemij pri otrocih.

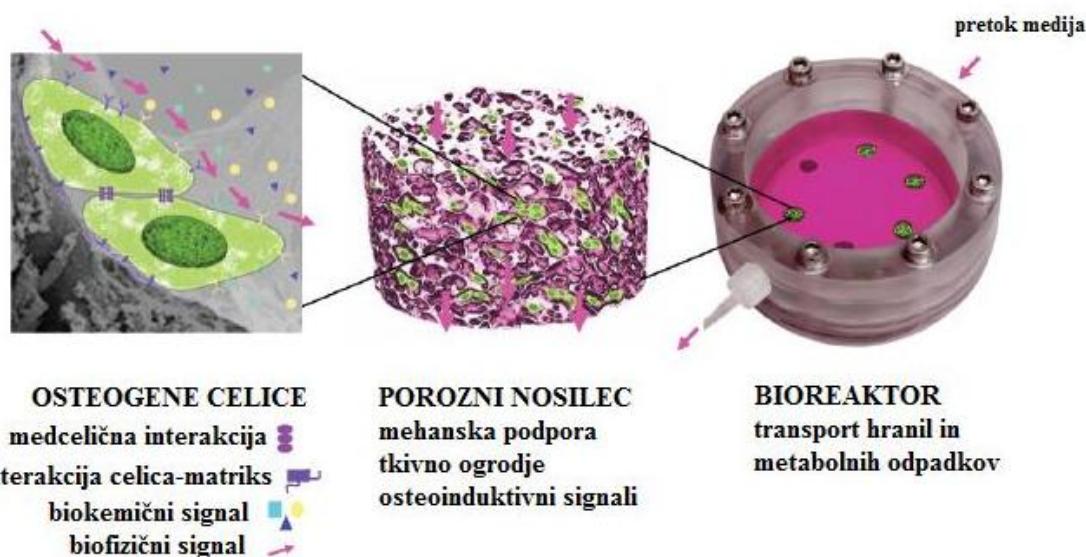
Posebna skupina celic s pluripotentnim potencialom so tako imenovane inducirane pluripotentne matične celice (angl. Induced Pluripotent Stem Cells, iPSC). iPSC so somatske celice, ki so bile najprej pridobljene z vnosom štirih transkripcijskih faktorjev za pluripotentnost (Oct-4, Sox-2, c-myc, Klf-4), s čimer so bile *in vitro* reprogramirane tako, da so pridobile lastnosti, podobne pluripotentnim embrionalnim matičnim celicam (Takahasi in Yamanaka, 2006). iPSC predstavljajo vir pluripotentnih celic, pridobljen na etično sprejmeljiv način, vendar pa je njihova uporaba v kliniki omejena zaradi uporabe genetske manipulacije pri postopku reprogramiranja. V **Preglednici 1** so povzete značilnosti različnih tipov matičnih celic.

Preglednica 1: Glavni tipi matičnih celic

	Embrionalne matične celice	Matične celice odraslega	Matične celice iz popkovnične krvi	Inducirane pluripotentne matične celice (iPSC)
Vir	ICM iz blastociste	Kostni mozeg, maščobno tkivo, vezivna tkiva, ostala odrasla tkiva	Popkovnična kri	Somatske celice, v katere so z virusno transfekcijo vnešeni transkripcijski faktorji za vzdrževanje pluripotentnosti
Potentnost	Pluripotentne	Multi- ali unipotentne	Multi- ali unipotentne	Pluripotentne
Omejitve	Etične omejitve, teratogenost	Invasivno pridobivanje, omejeno podvojevanje v kulturi	Omejen volumen popkovnične krvi, ki ga lahko pridobimo od enega darovalca.	Genetska manipulacija

Spoznanja o matičnih celicah so spodbudila zanimanje za možnost uporabe teh celic v regenerativni medicini. Regenerativna medicina se nanaša na skupino biomedicinskih pristopov in lahko vključuje uporabo matičnih celic (Riazi in sod., 2009). Zdravljenje poteka s stimulacijo organov, da se regenerirajo sami, ali pa s presaditvijo *in vitro* vzgojenih tkiv ali organov v primerih, ko je poškodba prevelika in se telo samo ne more več regenerirati. Primeri so injiciranje matičnih ali predniških celic (celična terapija),

indukcija regeneracije z uporabo biološko aktivnih molekul ter presaditev *in vitro* gojenih organov in tkiv (tkivno inženirstvo) (Muneoka in sod., 2008). Langer in Vacanti (1993) sta tkivno inženirstvo definirala kot interdisciplinarno področje, ki združuje načela inženirstva in naravoslovja z razvojem bioloških nadomestkov, ki vzdržujejo, obnavljajo ali izboljšujejo tkiva ali organe. Biomimetičen pristop k tkivnemu inženirstvu za *in vitro* ustvarjanje tkiv predvideva integrirano uporabo celic, nosilcev za celice iz biomaterialov ter bioreaktorjev (**Slika 1**). Celice so »dejanski tkivni inženirji«, nosilec je potreben za strukturno in mehansko oporo celicam, bioreaktorski sistem pa zagotavlja primerno okolje, v katerem lahko celice regenerirajo funkcionalno tkivo (Grayson in sod., 2009).



Slika 1: Tkvino inženirski pristop za gojenje kostnega tkiva *in vitro* (Marolt in sod., 2010: 2)

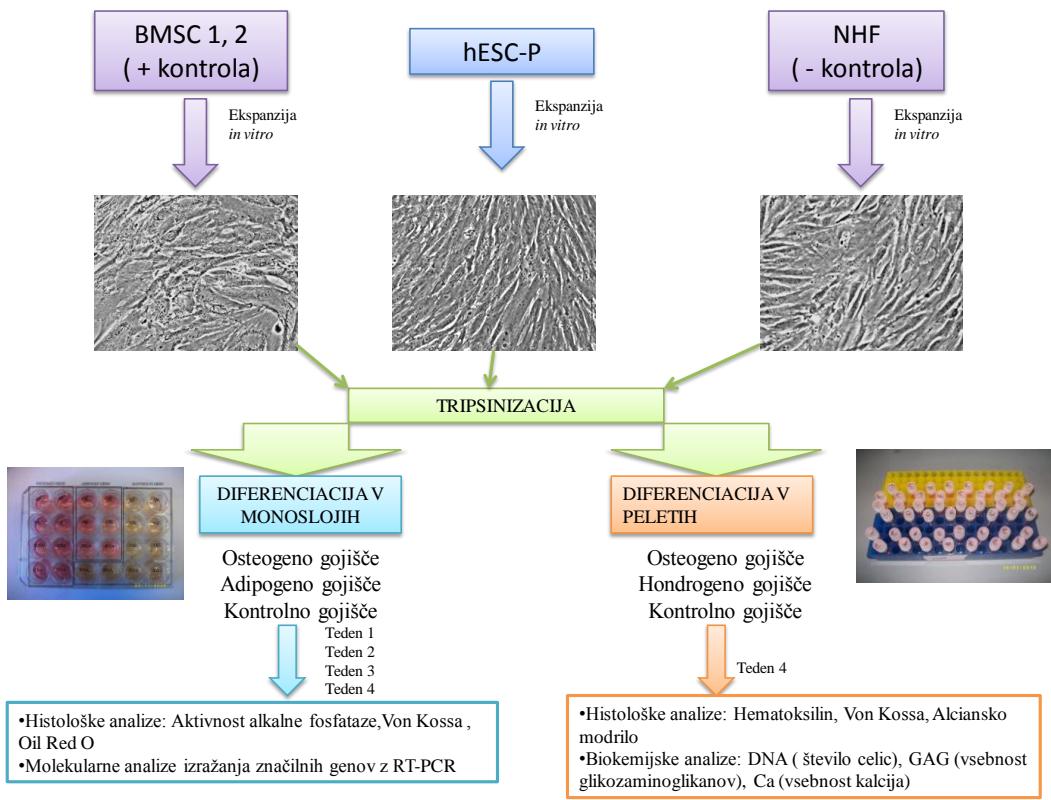
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Človeške embrionalne matične celice predstavljajo količinsko neomejen vir univerzalnih celic za uporabo v regenerativni medicini in tkivnem inženirstvu (Barberi in Struder, 2006). Njihov pluripotenten značaj jim omogoča, da teoretično lahko tvorijo kateregakoli izmed 200 celičnih tipov, ki se nahajajo v našem telesu. Spontana diferenciacija hESC v miših s hudo kombinirano imunsko pomanjkljivostjo (angl. Severe Combined Immunodeficiency, SCID) privede do nastanka teratomov, tumorjev, ki so sestavljeni iz različnih mezo-, endo- in ektodermalnih tkiv (Reubinoff in sod., 2000; Thomson in sod., 1998). Praktična uporaba hESC temelji na razvoju enostavnih in učinkovitih protokolov za usmerjeno diferenciacijo celic. Pridobljena celična populacija mora biti uniformna, enostavna za gojenje, mora preživeti *in vivo* transplantacijo in tvoriti funkcionalno tkivo brez tveganja nastanka tumorjev. Mezenhimske matične celic (angl. Mesenchymal Stem Cell, MSC), ki so jih izolirali iz kostnega mozga (Pittenger in sod., 1999), maščobnega tkiva (Zuk in sod., 2001) in vezivnih tkiv (Young in sod., 2001), prav tako predstavljajo potencialen vir celic za uporabo v regenerativni medicini. Vendar pa je število celic, ki jih lahko pridobimo iz enega darovalca, v nekaterih primerih majhno, sposobnost proliferacije celic *in vitro* pa je omejena (Baxter in sod., 2004). V nasprotju z MSC imajo hESC neomejen proliferacijski potencial *in vitro*, z usmerjeno diferenciacijo hESC v

mezenhimalno usodo pa lahko teoretično pridobimo neomejeno količino mezenhimskeih celic, ki jih lahko diferenciramo v različne specializirane celice. Razumevanje diferenciacije hESC po korakih do mezenhimske matične celice je pomembno tudi pri študijah razvojne biologije, vključno z molekularnimi mehanizmi, ki uravnavajo specifikacijo in razvoj mezoderma pri človeku (Barberi in Studer, 2006). Možnost proizvodnje neomejene količine identičnih MSC iz hESC ima tudi velik terapevtski potencial. Celice, ki bi bile sposobne tvoriti kostnino in hrustančno tkivo, bi bile potencialno uporabne v rekonstruktivni kirurgiji. Primer so poškodbe in okvare, kjer je potrebna regeneracija večjih delov kosti, možnosti za presaditev primernega tipa hrustanca ali kosti pa so količinsko omejene. Klinično pomembna aplikacija je tudi uporaba skeletnih mioblastov za regeneracijo mišičnih poškodb (Barberi in Studer, 2006).

1.2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je karakterizacija predniških celic, pridobljenih iz humanih embrionalnih matičnih celic (angl. Human Embryonic Stem Cell-derived Progenitor Cells, hESC-P) za uporabo v tkivnem inženirstvu kostnega in hrustančnega tkiva. Preveriti smo žeeli morfološke značilnosti hESC-P, vpliv podaljšanega gojenja na celični fenotip in morfologijo ter sposobnost diferenciacije celic v različna mezenhimska tkiva (kost, hrustanec in maščobno tkivo). V ta namen smo uporabili modela diferenciacije v monoslojni kulturi in v enostavnih tridimenzionalnih pogojih. Rezultate smo primerjali z matičnimi celicami iz kostnega mozga (angl. Bone Marrow-derived Stem Cells, BMSC) kot referenčnim virom celic za regeneracijo mezenhimskeih tkiv, in kožnimi fibroblasti (angl. Normal Human Fibroblasts, NHF) kot virom specializiranih celic z omejeno sposobnostjo diferenciacije. Ker želimo hESC-P uporabiti v tkivnem inženirstvu kosti, smo preverjali tudi njihovo sposobnost pritrditve na celični nosilec iz decellularizirane kosti, ki lahko tvori osnovno strukturo (biološki nosilec) za razvoj kostnega tkiva *in vitro*. **Slika 2** prikazuje organizacijsko shemo poteka poskusov.



Slika 2: Shema poteka poskusov

1.3 HIPOTEZA

Pred pričetkom eksperimentalnega dela smo postavili naslednje delovne hipoteze:

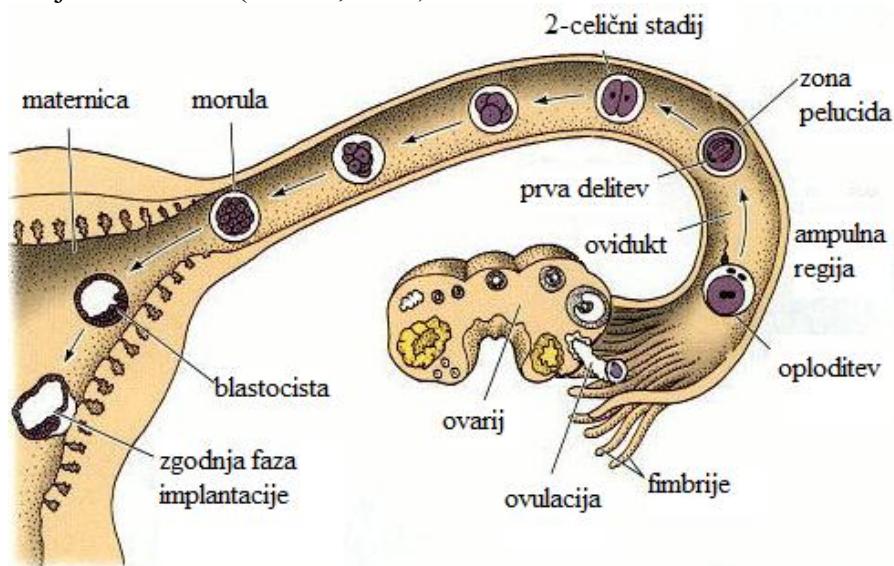
- hESC-P se bodo v kulturi obnašale podobno kot BMSC in pri podaljšanemu gojenju (12 pasaž) ne bodo kazale nobenih morfoloških sprememb,
- celice bomo uspešno diferencirali v vsaj enega izmed specializiranih mezenhimskih celičnih tipov (osteoblasti, hondrocyti, adipociti),
- celice hESC-P bodo primerljivo odzivne na indukcijo diferenciacije kot BMSC,
- ker so BMSC heterogena populacije in ker je njihov diferenciacijski potencial odvisen od starosti dajalca in drugih genetskih dejavnikov bomo zaznali razlike v diferenciacijskem potencialu med celicami različnih ljudi,
- hESC-P se bodo uspešno pritrdile na nosilec iz decelularizirane goveje kosti, ohranile viabilnost ter se v treh dneh kultivacije pričele razmnoževati.

2 PREGLED OBJAV

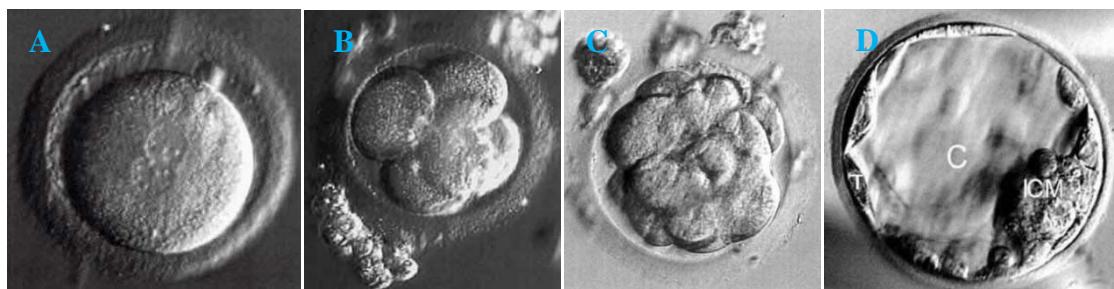
2.1 ZGODNJI RAZVOJ ČLOVEKA IN EMBRIONALNE MATIČNE CELICE

2.1.1 Oploditev, brazdanje in gastrulacija

Razvoj človeka se začne z oploditvijo v jajcevodu, regiji, ki se nahaja v bližini ovarija (**Slika 3**). Cilije v oviduktu potiskajo zigoto proti maternici, prva delitev se začne približno dan kasneje. Brazdanje pri sesalcih je med najpočasnejšimi v živalskem kraljestvu, poteka na vsake 12-14 ur (**Slika 4**). Genom zarodka se aktivira zelo zgodaj in proizvaja proteine, potrebne za brazdanje. Na 8-celični stopnji pride do kompakcije zarodka. 16-celično stanje zarodka se imenuje morula. Sestoji iz manjše skupine notranjih celic, ki so obdane z večjo skupino zunanjih celic. Potomke zunanjih celic se razvijejo v trofoblast (trofektoderm), ki je potreben za pritrdirtev zarodka na steno maternice in tvori horion, embrionalni del placent. Potomke notranjih celic tvorijo notranjo celično maso (angl. Inner Cell Mass, ICM), iz katere se bo razvil embrij in izvenembrionalne membrane. Razvoj trofoblasta in notranje celične mase, ki skupaj tvorita blastocisto, predstavlja prvi diferenciacijski dogodek v embrionalnem razvoju sesalcev. Celice ICM izločajo fibroblastni rastni faktor-4 (angl. Fibroblast Growth Factor 4, FGF-4), ki spodbuja delitev celic trofoblasta. V maternici se približno 3 dni star zarodek vgnezdi v steno maternice (implantacija). Blastocista se pred gastrulacijo preoblikuje: iz notranje celične mase se loči plast celic, ki tvori hipoblast, čigar celice se razvijejo v endoderm rumenjakove vrečke in ne prispevajo k tvorbi samega zarodka. Preostali del celične mase se imenuje epiblast in vsebuje celice, ki bodo tvorile zarodek in amnion, ki predstavlja oblogo celic okoli amnijske votline, ki se napolni z amnijsko tekočino (Gilbert, 2006).

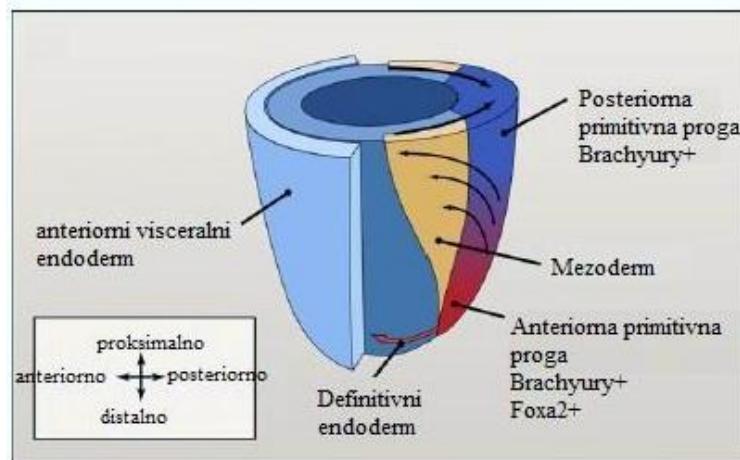


Slika 3: Razvoj človeškega zarodka od oploditve do implantacije (Gilbert, 2006: 348)



Slika 4: Različne predimplantacijeske stopnje zarodka. (A) oplojeno jajče, dan 0. Na sliki sta vidna pronukleusa iz jajčne celice in spermija, ki se bosta kmalu združila. (B) 4-celični stadij, dan 2. (C) morula, dan 4. (D) blastocista, dan 5. Celice, ki bodo tvorile zarodek so označene z ICM (Pictures..., 2010).

Embrionalni razvoj se nadaljuje z gastrulacijo, med katero se razvijejo primarne zarodne (klične) plasti: ektoderm, mezoderm in endoderm, iz katerih kasneje nastanejo tkiva odraslega organizma (**Preglednica 2**). Gastrulacija se začne s tvorbo primitivne proge (PP), skozi katero celice potujejo (invaginirajo) in tvorijo mezoderm ali endoderm (**Slika 5**). Študije so pokazale razlike v izražanju genov v različnih delih primitivne proge: *brachyury* (*T*) in *mixl1* sta izražena enakomerno vzdolž PP, drugi geni so močneje izraženi v anteriorni regiji (*foxa2* in *goosecoid*) ali v posteriorni regiji (*hoxB1*, *evx1*) PP. Populacije vzdolž primitivne proge pa se tudi razlikujejo v razvojnem potencialu. Tako razporeditev mezo- in endodermalnih populacij ni naključna, temveč je kontrolirana časovno in prostorsko (Kindler in sod., 1999). Ektoderm nastane iz celic anteriorene regije epiblasta, ki ne migrirajo skozi primitivno progo. Uravnavanje nastanka primitivne proge še ni natančno raziskano, znano pa je, da je tvorba embrionalnih zarodnih plasti dinamičen proces, ki je delno nadzorovan s koordinirano aktivacijo in regionalno inhibicijo signalnih poti Wnt, Nodal in BMP (Murry in sod., 2008).



Slika 5: Usmerjena gibanja celic pri gastrulaciji (Murry in sod., 2008: 662)

Preglednica 1: Somatske plasti in njihovi derivati (Rožman in sod., 2007: 204)

Endoderm	Mezoderm	Ektoderm
Priželjc	Kostni mozeg (kri)	Koža
Ščitnica, obščitnična žleza	Skorja nadledvične žleze	Živčna tkiva (nevroektoderm)
Požiralnik, sapnik, pljuča	Limfni organi	Sredica nadledvične žleze
Sečila, vagina, maternica	Skeletne, gladke in srčne mišice	Hipofiza
Gastrointestinalni organi, jetra	Vezivna tkiva, kosti, hrustanec	Vezivna tkiva glave in obraza
Trebušna slinavka, celice prebavil	Sečila in splovila	Oči, ušesa
Celice dihal	Srce in ožilje	

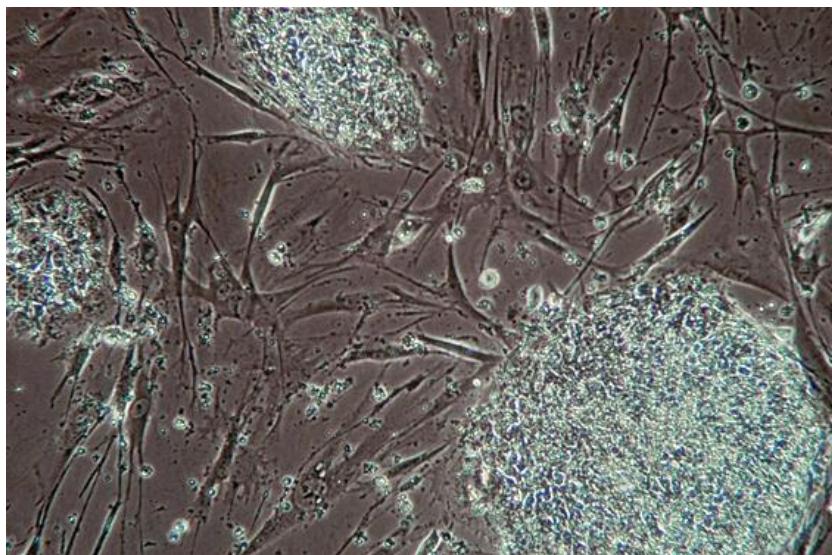
Med gastrulacijo pride do specifikacije mezoderma in nastanka hrbtnne strune, paraksialnega, intermediarnega ter mezoderma lateralnih plošč. Kosti in hrustančno tkivo različnih skeletnih elementov se razvijejo iz populacij paraksialnega mezoderma (vretanca, rebara), mezoderma lateralnih plošč (dolge kosti okončin) in populacije nevralnega grebena (kosti lobanje in obraza) (Gilbert, 2006).

2.2 EMBRIONALNE MATIČNE CELICE (ESC)

2.2.1 Pridobivanje in gojenje

Prve embrionalne matične celice iz mišje blastociste so pridobili leta 1981 (Evans in sod., 1981), leta 1998 pa je Thompsonu in sod. prvič uspelo pridobiti humane ESC iz človeških zarodkov, ki so ostali po *in vitro* fertilizaciji. Predimplantacijski zarodki (na stopnji morule ali blastociste) so bili darovani za raziskave bodisi ker so bili presežki ali pa slabe kvalitete. Zarodkom so najprej odstranili glikoproteinsko ovojnicico, zono pelucido, nato pa so ICM iz zarodka izolirali mehansko ali imunokirurško ter jih prenesli na hranilno plast celic.

hESC *in vitro* gojimo na hranilni plasti celic (**Slika 6**), ki predstavlja substrat za pritrjevanje ter izloča regulatorne molekule in parakrine faktorje, kot sta fibroblastni rastni faktor (angl. Fibroblast Growth Factor, FGF) in inzulin podoben rastni faktor (angl. Insulin-like Growth Factor, IGF), ki spodbujata nediferencirano stanje hESC (Godier in sod., 2008). Najpogosteje uporabljena hranilna plast so mitotsko inaktivirani mišji embrionalni fibroblasti (Thompson in sod. 1998) in celična linija STO (Richards in sod., 2002; Park in sod., 2003). Ker so hESC, ki jih gojimo na hranilni plasti živalskega izvora, zaradi možnosti prenosa virusnih infekcij in patogenov na človeka neprimerne za uporabo v kliniki, se je pojavila potreba po hranilnih plasteh človeškega izvora. hESC so uspešno ohranile nediferenciran fenotip na hranilnih plasteh iz humanih embrionalnih fibroblastov, humanih fetalnih kožnih fibroblastov, humanih kožnih fibroblastov (Richards in sod., 2002) ter humanih materničnih endometrijskih celic (Lee in sod., 2005).



Slika 6: hESC v kulturi. Kolonija hESC raste na hranični plasti mitotsko inaktiviranih embrionalnih fibroblastov (Miller, 2005)

2.2.2 Karakterizacija in fenotip hESC

V najširšem smislu so hESC definirane kot celice z naslednjimi karakteristikami: (1) izvor iz notranje celične mase blastociste, (2) intenzivna proliferacija *in vitro*, (3) vzdrževanje normalnega evploidnega kariotipa skozi podaljšano kultivacijo, (4) diferenciacija v derivate vseh treh zarodnih plasti, (5) visoka raven izražanja Oct-4, (6) prisotna telomerazna aktivnost (Hoffman in sod., 2005). Najboljši dokaz pluripotentnega razvojnega potenciala ESC je sposobnost nastanka himer pri miših. ESC po injekciji v mišjo blastocisto prispevajo k različnim tkivom razvijajočega zarodka. Takšen pristop je mogoč pri mišjih ESC, ni pa primeren za humane ESC. Za potrditev pluripotentnosti pri hESC se trenutno uporablja indukcija embrioidnih teles *in vitro* in injekcija celic v SCID miš ter ugotavljanje nastanka teratomov *in vivo*. Nastanek derivatov ekto-, endo- in mezoderma pri spontani differenciaciji hESC je v obeh primerih dokaz za pluripotentnost celic.

Najpogosteje uporabljene metode za karakterizacijo hESC so analiza izražanja značilnih površinskih proteinov s pretočno citometrijo in analiza izražanja genov z RT-PCR ali z mikromrežami.

Za nediferencirane hESC je značilno izražanje naslednjih antigenov:

- Stage-Specific Embryonic Antigen 3 in 4 (SSEA-4, SSEA-3) (glikolipidi),
- TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM2 in GCT343 (keratanosulfati),
- CD9, Thy1 (CD90), tkivno nespecifična alkalna fosfataza, razred I HLA (proteini).

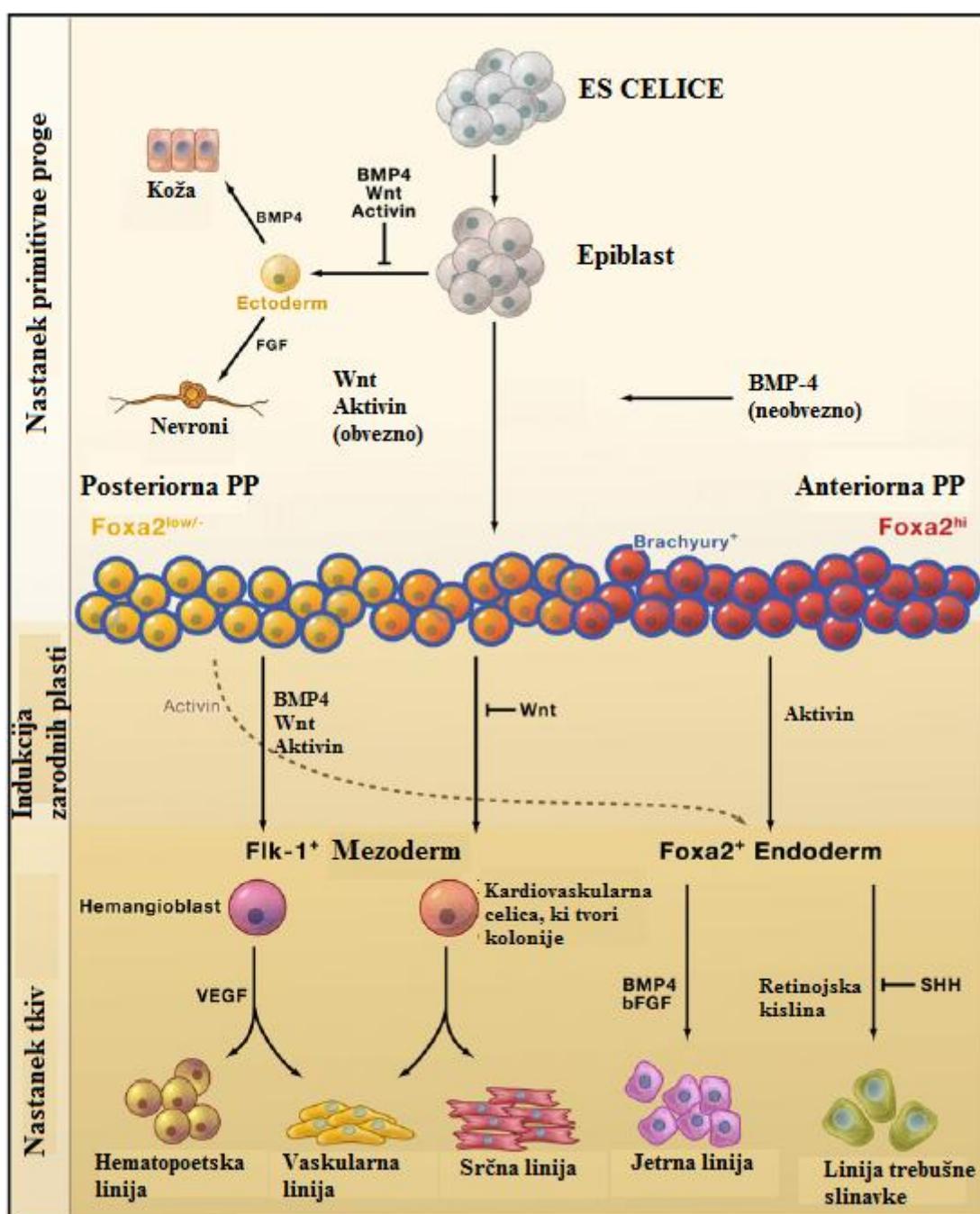
Na nivoju mRNA je značilno močno povišanje izražanja genov NANOG, POU5F1 (staro ime OCT-4), SOX-2, TDGF1, DNMT3B, GABRB3 in GDF3 (The international stem cell initiative, 2007).

Genetske študije so pokazale, da so transkripcijski faktorji Oct-4, Sox-2 in Nanog centralni regulatorji vzdrževanja pluripotentnosti hESC (Chambers in sod., 2003). Motnje izražanja Oct-4 in Nanog imajo za posledico izgubo pluripotentnosti ter diferenciacijo ICM in ESC v trofektoderm in ekstraembrionalni endoderm (Chambers in sod., 2003). Identifikacija genov, na katere vplivajo Oct-4, Sox-2 in Nanog, je omogočila vpogled v molekularne mehanizme, s katerimi ti transkripcijski faktorji prispevajo k vzdrževanju pluripotence. Ključna spoznanja, ki so jih prinesli eksperimenti, so: Oct-4, Sox-2 in Nanog (1) se vežejo na lastne promotorje in tvorijo med seboj povezano avtoregulatorno zanko, (2) koordinirano regulirajo tarčne gene ter (3) hkrati uravnavajo izražanje genov, ki so aktivni in pomembni za vzdrževanje pluripotence, ter genov, ki so v nediferenciranih ESC utišani, in sodelujejo v diferenciacijskih poteh (Boyer in sod., 2005).

2.3 DIFERENCIACIJA ESC Z UPORABO RASTNIH FAKTORJEV

Z uporabo spoznanj iz embriologije in z manipulacijo razvojnih poti je bilo mogoče postaviti model za usmeritev diferenciacije embrionalnih matičnih celic (**Slika 7**). Prvi korak v diferenciaciji ESC je razvoj populacije celic, ki je podobna epiblastu. Po indukciji s proteinom »Wingless« (Wnt), kostnim morfogenetskim proteinom 4 (angl. Bone Morphogenetic Protein 4, BMP-4), aktivinom ali serumom se celice epiblasta razvijejo v populacije, ki so podobne primitivni progi *in vivo*. Če ta razvojna pot ni aktivirana, se celice spontano diferencirajo v ektoderm. Ektodermalna diferenciacija je blokirana s signalnimi potmi BMP, Wnt in aktivina. Po indukciji se posteriorne celice primitivne proge diferencirajo v mezoderm, ki izraža fetalno jetrno kinazo 1 (angl. Fetal Liver Kinase 1, Flk-1). Flk-1 je receptor za rastni faktor žilnega endotelija (angl. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). Anteriorne celice primitivne proge se diferencirajo v Foxa-2 (angl. Forkhead box a2) definitivni endoderm. Foxa-2 hepatocitni jedrni faktor je transkripcijski aktivator za gene, ki so značilni za jetra, kot je albumin. Usoda celic na tej stopnji razvoja še ni dokončno določena, saj lahko z aktivinom induciramo tvorbo endoderma na posteriornem delu primitivne proge (**Slika 7**).

V študijah diferenciacije ESC se izražanje proteina Brachyury povezuje z razvojem v mezoderm (Yamaguchi in sod., 1999). Dodajanje BMP-4 brezserumskemu diferenciacijskemu mediju inducira Brachyury-pozitivno populacijo in nadaljnji razvoj mezoderma (Wiles in sod., 1999; Park in sod., 2004). Prav tako je za razvoj mezoderma potrebna signalna pot Wnt, saj njena blokada inhibira izražanje Brachyury (Lindsley in sod., 2006). Aktivacija signalne poti faktorja Nodal dodajanjem Aktivina A inducira razvoj populacij primitivne proge, in posledično nastanek endoderma ali mezoderma, odvisno od intenzitete signala (Kubo in sod., 2004). Zaključimo lahko, da imajo signalne poti BMP, Wnt in Nodal v zgodnji diferenciaciji ESC enako vlogo kot v embrionalnem razvoju (**Slika 7**).



Slika 7: Model regulacije diferenciacije embrionalnih matičnih celic v kulturi (Murry in Keller, 2008: 663)

2.4 MEZENHIMSKE CELICE, PRIDOBLJENE IZ HESC

Spontana diferenciacija hESC v SCID miši *in vivo* privede do nastanka teratomov, tumorjev, ki vsebujejo različna mezenhimska tkiva, kot na primer hrustanec, kost in mišice ter tudi različne ekto- in endodermalne derivate (Reubinoff in sod., 2000; Thomson in sod., 1998). Praktična raba hESC temelji na razvoju preprostih in učinkovitih protokolov za diferenciacijo hESC. Pridobljena populacija celic mora biti enostavna za kultivacijo, uniformna ter sposobna tvorbe funkcionalnega tkiva (Hwang in sod., 2008).

2.4.1 Pristopi za usmerjeno diferenciacijo hESC v mezenhimske celice

Prvi poskusi usmerjene diferenciacije hESC so se naslanjali na protokole in odkritja iz študij mišjih ESC. Eden prvih pristopov za pridobivanje diferenciranih celic iz mESC pri miših je indukcija diferenciacije s tvorbo embrioidnih teles (angl. Embryoid Body, EB). EB so sferične strukture, sestavljene iz ESC, ki jih lahko pripravimo iz enoceličnih suspenzij ali agregatov ESC. Agregacija celic v EB inducira celično diferenciacijo in nastanek derivatov vseh treh zarodnih plasti. EB posnemajo strukturo razvijajočega embrija in so pomembno orodje za proučevanje poteka diferenciacije ESC.

Glavni metodi za pridobivanje EB sta resuspendiranje ESC (Itskovitz-Eldor in sod., 2000) ter metoda visečih kapljic (Yamada in sod., 2002). Težavo pri diferenciaciji hESC v embrioidnih telesih predstavlja njihova heterogena velikosti in sestava (Mateizel in sod., 2008). V novejših študijah so uspeli kontrolirati velikost EB, pridobljenih iz enoceličnih suspenzij (Bauwens in sod., 2008; Ungrin in sod., 2008). Ugotovili so, da predhodna diferenciacija celic v prisotnosti seruma ter dodatek inhibitorja ROCK (angl. Rho-associated coiled-coil kinase) pozitivno vplivata na stabilnost celičnih agregatov (Ungrin in sod., 2008). Inhibitor ROCK zmanjšuje apoptozo hESC, ki je značilna po disociaciji celic (Watanabe in sod., 2008).

Karp in sod. (2006) so diferencirali hESC brez priprave EB in nepričakovano pridobili sedemkrat večje število osteogenih celic v primerjavi s paralelnim poskusom, ki je vključeval pripravo EB. Podobno so resuspendirane hESC diferencirali Lian in sod. (2007), v nekaterih študijah pa so mehansko izolirali celice, ki so se spontano diferencirale na robovih kolonij hESC (Olivier in sod., 2006; Trivedi in sod., 2008).

Tretji pristop za usmerjeno diferenciacijo hESC je kokultivacija z drugimi celicami človeškega ali živalskega izvora. Barberi in sod. (2006) so hESC gojili na mišjih stromalnih celicah OP9 in nato s pretočno citomerijo izolirali celice, ki so izražale površinske označevalce, značilne za mezenhimske matične celice. Kokultivacija s celicami živalskega izvora povečuje možnost za prenos ksenogenih patogenov, zato je klinično nesprejemljiva. Za pridobitev osteogenih predniških celic iz hESC je bila opisana tudi kokultivacija s humanimi primarnimi kostnimi celicami (Ahn in sod., 2006) in s humanimi periodontalnimi fibroblasti (Inanc in sod., 2007).

2.4.2 Lastnosti pridobljenih celičnih populacij

Nekateri avtorji so želeli iz hESC pridobiti specifične celične tipe, npr. osteoblaste, adipocyte ter hondrocite. Diferenciacijo hESC so inducirali s pripravo embrioidnih teles, nato pa so pridobljene populacije inducirali v gojiščih z rastnimi faktorji in tako spodbudili diferenciacijo v želeni celični tip. Mateizel in sod. (2008) poročajo o osteogeni diferenciaciji hESC v prisotnosti 20 % fetalnega telecjega seruma (angl. Fetal Bovine Serum, FBS) in brez dodanih osteogenih indukcijskih dejavnikov. Drugi avtorji so želeli iz hESC najprej pridobiti multipotentno populacijo celic, ki bi bila podobna mezenhimskim matičnim celicam, in jih nato inducirati v različne tipe celic. **Preglednica 3** prikazuje glavne metode za indukcijo diferenciacije hESC v mezenhimske linije, diferenciacijski potencial pridobljenih celic ter običajne metode, ki se uporabljajo pri karakterizaciji pridobljenih celičnih populacij.

Preglednica 2: Različni načini indukcije diferenciacije hESC in metode za karakterizacijo pridobljene celične populacije

Metoda indukcije diferenciacije ESC	Referenca	hESC linija	Diferencijski potencial pridobljenih celic	Običajne metode za karakterizacijo	
Priprava EB	Bielby in sod., 2004	H1	osteogen	Opazovanje morfologije: <i>fibroblastna morfologija, sposobnost pritrditve na plastiko</i>	
	Sottile in sod., 2003	H1, H9, H9, THG15		Stabilen kariotip pri podaljšanem gojenju: <i>G-proganje</i>	
	Xu in sod., 2006	H1, H7, H9		Histologija: <i>in vivo tvorba teratomov</i>	
	Xiong in sod., 2005	H1		Površinski antigeni: <i>pretočna citometrija, imunohistokemija</i> , pozitivno: CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, negativno: CD34, CD45	
	Hwang in sod., 2006	BG02	hondrogen	Osteogena diferenciacija: mineralizacija (<i>barvanje Von Kossa in Alizarin S, biokemična kvantifikacija kalcija</i>), aktivnost alkaline fosfataze, gensko izražanje <i>Cbfa-1, Kol-I, OCN, OPN, BSP</i>	
	Brown in sod., 2009	BG01	osteogen in adipogen		
	Hwang in sod., 2008	Hues9	osteogen, adipogen in hondrogen		
	Lee in sod., 2010	SNUhES3, CHA3-hESC, H9			
Brez EB	Karp in sod., 2004	H9	osteogen	Adipogena diferenciacija: akumulacija lipidnih vakuol (<i>Oil Red O</i>), izločanje leptina (<i>ELISA</i>), gensko izražanje <i>PPARγ, aP2, LPL</i>	
	Mateizel in sod., 2008	VUB01, VUB02, VUB03_DM1			
	Boyd in sod., 2009	H9, BG01			
	Olivier in sod., 2006	H1	osteogen, adipogen in hondrogen	Hondrogena diferenciacija: kopiranje glikozaminoglikanov (<i>barvanje Alciansko modrilo, Safranin O, biokemična kvantifikacija glikozaminoglikanov</i>), gensko izražanje <i>Agrekan, Kol-II</i>	
	Lian in sod., 2007	H1, Hues1			
	Trivedi in Hematti, 2007	H1, H7, H9			
Kokultivacija	Ahn in sod., 2006	Cha-hES3	osteogen		
	Inanc in sod., 2007	HUES-9			
	Barberi in sod., 2005	H1, H9	osteogen, adipogen in hondrogen		
Označbe ESC linij so navedene kot v prvotni referenci. Cbfa-1 (angl. Core Binding Factor α-1); Kol-1, kolagen tipa I; OCN, osteokalcin; OPN, osteopontin; BSP, kostni sialoprotein; ELISA (angl. encimskoimunski test (angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay); PPAR γ , s peroksisomsko proliferacijo aktiviran receptor γ (angl- Peroxisome Proliferation Activated Receptor γ); aP2, adipocitni maščobno kislinski vezni protein 2 (angl. Adipocyte Fatty Acid Binding Protein 2); LPL, lipoproteinska lipaza, Kol-II, kolagen tipa II.					

Hwang in sod. (2008) ter Boyd in sod. (2009) so pri diferenciaciji hESC opazili epitelno-mezodermalno tranzicijo (EMT), pojav, ki je značilen za embrionalni razvoj, kjer iz epitelnih celic nastane mezodermalno tkivo. V EMT pot so vpleteni številni transkripcijski faktorji, ki regulirajo izražanje genov in so odgovorni za mezenhimski celični fenotip (Radisky, 2005). Trivedi in sod. (2008) je prvi opisal imunološke značilnosti iz hESC pridobljenih mezenhimskih celic.

Največja prednost uporabe mezenhimskih celic, pridobljenih iz hESC, je neomejena količina celic, ki jih lahko pridobimo, pomanjkljivosti pa so v v vprašljivi homogenosti pridobljene celične populacije in s tem povezani nevarnosti za nastanek teratomov.

2.5 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE (MSC)

Mezenhimske matične celice so zaradi njihovega multipotentnega značaja in prisotnosti v različnih odraslih tkivih pogost vir celic za uporabo v regenerativni medicini.

2.5.1 Identifikacija in tkivni viri MSC

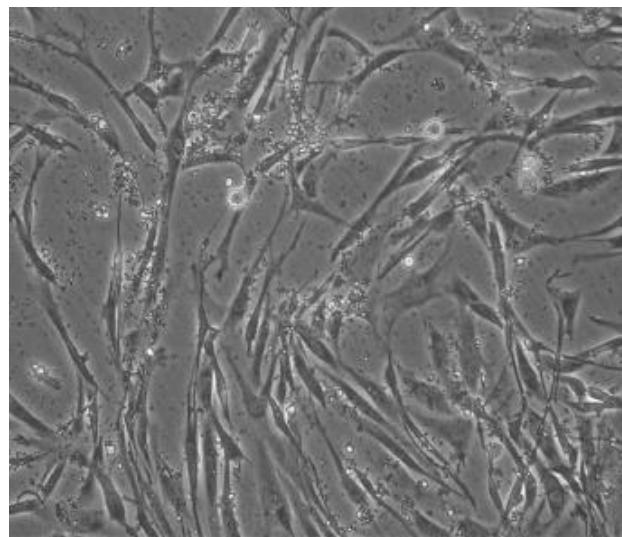
Multipotentni mezenhimski prekurzorji so bili prvič opisani v kostnem mozgu iz gvinejskega prašička kot fibroblasti, ki tvorijo kolonije (angl. Colony Forming Units Fibroblasts, CFU-F) (Friedenstein in sod., 1970). Njihov razvojni potencial je bil odkrit nekaj let kasneje, šele pred kratkim pa so bile celice bolj celostno okarakterizirane (Pittenger in sod., 1999).

Najbolj proučevan vir mezenhimskih matičnih celic je kostni mozeg (Pittenger in sod., 1999). Kostni mozeg je poleg MSC tudi vir hematopoetskih matičnih celic in je mesto hematopoeze. Količina MSC, pridobljenih iz stromalne frakcije kostnega mozga, se razlikuje med pacienti, predstavlja pa približno 0,001-0,1 % celic z jedri. Mezenhimske matične celice so odkrili tudi v drugih odraslih mezenhimskih tkivih, kot je maščobno tkivo (Zuk in sod., 2001), kožni dermis in druga vezivna tkiva (Young in sod., 2001). MSC so našli tudi v regijah razvijajočega embrija, kot so jetra (Campagnoli in sod., 2001) ter v popkovnični krvi (Broxymeyer in sod., 1989; Erices in sod., 2000).

2.5.2 Izolacija in *in vitro* kultivacija MSC

Izolacija MSC poteka na več načinov: iz aspirata kostnega mozga jih lahko izoliramo na podlagi adhezije na plastiko. Nekateri protokoli vključujejo korak z gradientno centrifugacijo, pri čemer izberemo in naprej kultiviramo mononuklearno frakcijo celic. Večjo čistost celic lahko dosežemo tudi s pozitivno ali negativno imunoselekcijo (**Preglednica 4**).

MSC običajno kultiviramo v Dulbeccovem modificiranem gojišču (angl. Dulbecco's Modified Eagles Medium, DMEM) ali v α -minimalnem esencialnem gojišču (angl. α -Minimum Essential Medium, α -MEM) z dodanim 10 % fetalnim telečim serumom pri 37° C in 5 % CO₂. Običajna celična gostota v kulturi je 50.000-100.000 celic/cm² (Gronthos in sod., 1994). MSC se v standardnih pogojih gojenja pritrdijo na plastiko ter pridobijo fibroblastom podobno vretenasto obliko (**Slika 8**).



Slika 8: Mezenhimske matične celice iz kostnega mozga v kulturi (Rožman in sod., 2007)

2.5.3 Fenotip

Za eksperimentalne namene se homogenost populacij MSC pogosto preverja z analizo izražanja površinskih antigenov s pretočno citometrijo. Za MSC je značilno izražanje naslednjih površinskih antigenov, predstavljeno v **Preglednici 4** (Pittenger in sod., 1999).

Preglednica 3: Izražanje površinskih proteinskih antigenov pri MSC

Pozitivna selekcija	Negativna selekcija
Integrini: CD49, CD29	Hematopoetski celični markerji: CD14, CD34, CD45
Citokinski receptorji: CD121a, CD124	Endotelijski celični markerji: CD31
Receptorji za rastne faktorje: CD120a, CD120b, CD140a, CD71 (transferin)	
Receptorji matriksa: CD54, CD106, CD166, CD44 (hialuronat), CD105 (endoglin)	
Ostali: CD90-Thy1 (fosfatidilinozitol), CD9 (tetraspanin)	

Potrebno je poudariti, da univerzalen marker, oziroma kombinacija markerjev, ki bi bila edinstvena samo za MSC, ni poznana. Vse zgoraj omenjene markerje lahko najdemo tudi pri drugih celičnih tipih. Ravno zato je izolacija MSC izliv, še zlasti kadar izhajamo iz mešane populacije celic. Za karakterizacijo MSC se najpogosteje uporablja kombinacija protiteles, ostaja pa potreba po funkcionalni definiciji MSC (Chen in sod., 2000).

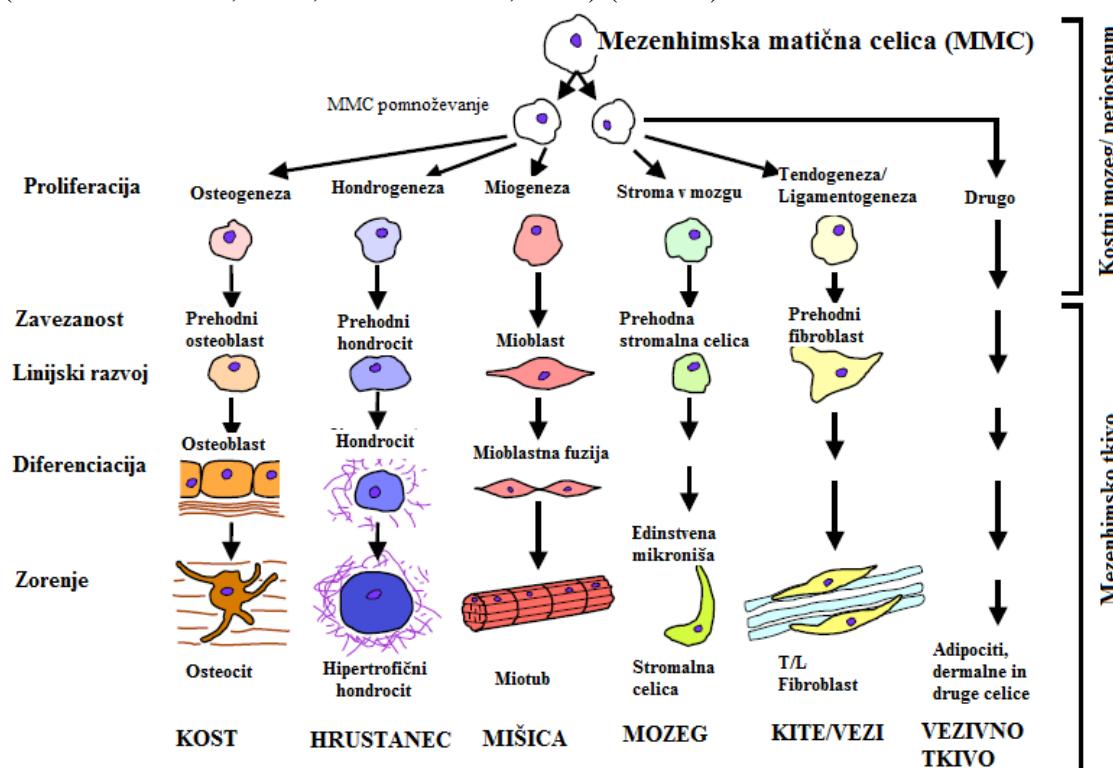
Primerjalne študije matičnih celic iz kostnega mozga (angl. Bone Marrow-derived Stem Cell, BMSC) in matičnih celic iz maščobnega tkiva (angl. Adipose-derived Stem Cell, ASC) so pokazale tako podobnosti kot razlike v izražanju površinskih markerjev. BMSC različnih donorjev izražajo CD44, CD71, CD90 in CD105, ne izražajo pa hematopoetskih in endotelijskih markerjev. V nasprotju se pri ASC v zgodnjih pasažah izraža CD34.

2.5.4 Sposobnost samoobnavljanja

MSC lahko v *in vitro* pogojih kultiviramo omejeno dolgo; 8-15 pasaž, kar ustreza 25-40 populacijskim podvojitvam. Če jih gojimo še naprej, postanejo senescentne ter se nehajo podvojevati (DiGirolamo in sod., 1999). Preveč konfluentne MSC imajo zmanjšan diferenciacijski potencial (Reyes in sod., 2001).

2.5.5 Multilinijski potencial

MSC imajo multipotenten diferenciacijski potencial. V *in vitro* pogojih jih lahko diferenciramo v osteogen, hondrogen in adipogen fenotip (Pittenger in sod., 1999). MSC so bile uspešno uporabljene tudi za generacijo vezi (Young in sod., 1998) in mišic (Galmiche in sod., 1993; Ferrari in sod., 1998) (Slika 9).



Slika 9: Diferenciacija mezenhimskih matičnih celic (Caplan, 2010: 7)

Multilinijski potencial odraslih matičnih celic se kvantitativno in kvalitativno preverja v 2- in 3-dimenzionalnih pogojih.

Osteogeno diferenciacijo se navadno testira v monoslojnih kulturah, kjer celice induciramo z mešanicami osteogenih faktorjev: L-askorbinska kislina, β -glicerofosfat, deksametazon in/ali vitamin D (Jaiswal in sod., 1997). Askorbinska kislina je potrebna za nastanek kolagena, β -glicerofosfat pa je pomemben za mineralizacijo kolagena (Davies, 1996). Deksametazon je sintetični glukokortikoid, ki deluje stimulativno na osteogeno diferenciacijo predniških celic iz različnih tkiv (Aubin, 1998).

Podobno se adipogena diferenciacija inducira v 2D kulturi z dodajanjem deksametazona, indometacina ter inzulina (Pittenger in sod., 1999; Gimble in sod., 2007).

Hondrogena diferenciacija se preverja v kulturah peletov ter mikromasah, ki posnemajo medcelične interakcije in zgoščevanje celic med osteohondralnim razvojem, in spodbujajo diferenciacijo MSC v hondrogen celični tip (Mackay in sod., 1998). Pelete se pripravi s centrifugiranjem nekaj stotisoč celic, ki po inkubaciji tvorijo trdne okrogle skupke celic. V kulturah mikromas gosto celično suspenzijo v obliki kapljic nasadimo na dno gojilne posode in tako vzpostavimo tridimenzionalno okolje. Hondrogeno induciramo z dodatkom deksametazona, inzulina, L-askorbinske kisline, mešanice inzulina-transferina-selena (ITS) ter tumorskega rastnega faktorja β (angl. Tumor Growth Factor β , TGF- β) (Pitterger in sod., 1999; Johnstone in sod., 1998). TGF- β je citokin, ki v kombinaciji z deksametazonom močno vzpodbudi hondrogeno diferenciacijo (Johnstone in sod., 1998). Mešanica ITS vsebuje goveji inzulin, transferin, selenovo kislino, linolno kislino in goveji serumski albumin. Dodatno nekateri protokoli hondrogenemu diferenciacijskemu mediju dodajo še L-glutamin, prolin in natrijev piruvat. **Preglednica 5** prikazuje različne inducijske dejavnike za diferenciacijo mezenhimskih matičnih celic ter molekularne in celične markerje, ki se najpogosteje uporabljajo za potrditev končnega fenotipa celic.

Preglednica 4: Preverjanje diferenciacijskega potenciala matičnih celic iz kostnega mozga *in vitro*; inducijski dejavniki, molekularni in celični markerji (Minguell in sod., 2001:510)

Diferenciacija celic v:	Indukcijski dejavnik	Označevalci diferenciacije v specifični fenotip Molekularni	Celični
Osteoblaste	askorbinska kislina + β -glicerofosfat + deksametazon (Jaiswal in sod., 1997)	Cbfa-1 Kostna/jetrna/ledvična različica alkalne fosfataze Kostni sialoprotein Osteopontin Osteokalcin Kolagen tipa I	Nastanek mineraliziranega matriksa (barvanji Von Kossa in Safranin O)
Adipocite	Deksamezaton + izobulmetilksantin + indometacin + inzulin (Pittenger in sod., 1999)	PPAR γ C/EBP β aP2 Adipsin Leptin Lipoproteinska lipaza	Citoplazemska akumulacija lipidnih kapljic (barvanje Oil Red O)
Hondrocyte	deksametazon + inzulin + aksorbinska kislina + tumorski rastni faktor β -1, + ITS suplement (Johnstone in sod., 1998)	Cbfa-1 Kolagen tipa II in IX Agrekan	Matriks, ki vsebuje proteoglikane in kolagen tipa II in IX (barvanje z alcianskim modrilom)

2.5.5.1 Potez osteogene diferenciacije MSC

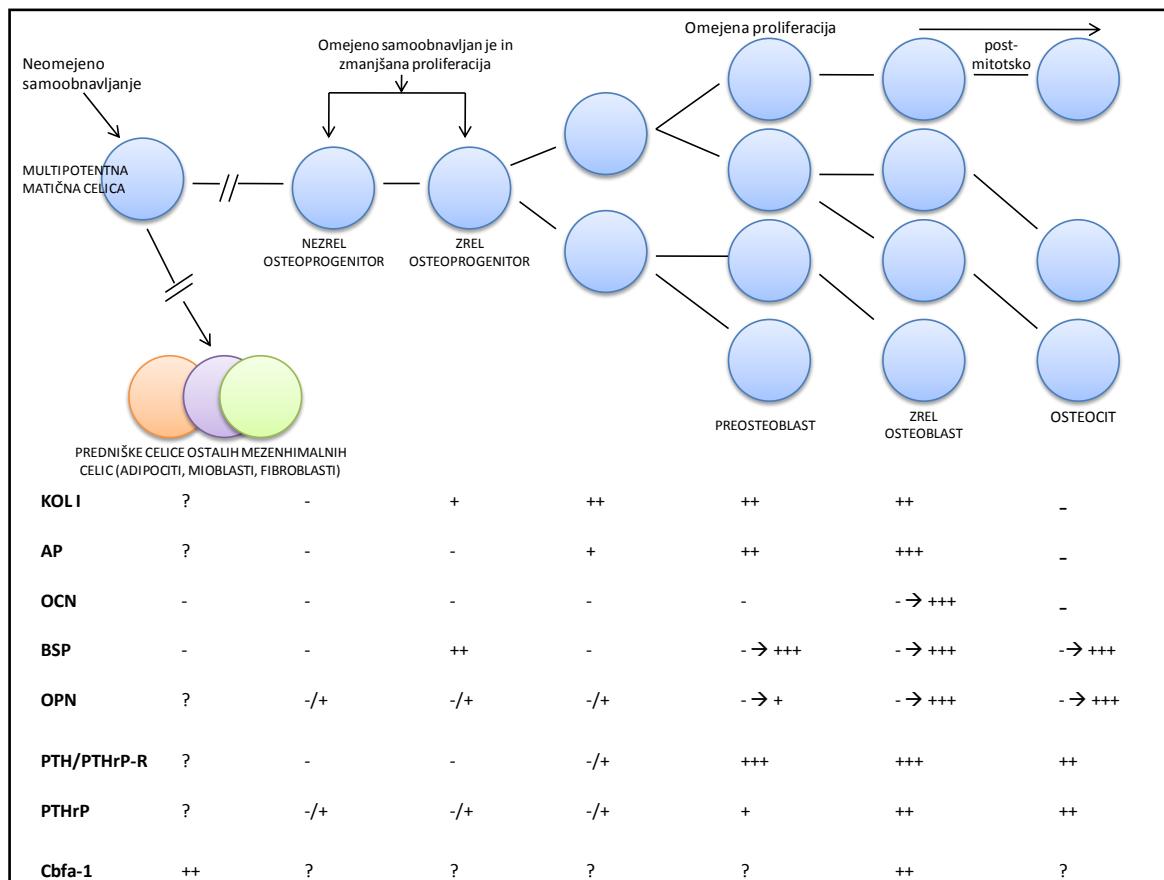
Osteoprogenitorske celice so potomke mezenhimskih matičnih celic. So unipotentne in so zavezane v osteblasten razvoj in formacijo kosti. Imajo omejeno samoobnovitveno sposobnost v kulturi (Bellows in sod., 1990). Zrela kostna celica - osteocit se razvije iz osteoprogenitorskih celic preko razvojnih stopenj preosteoblastov in osteoblastov (**Slika**

10). Osteoblasti so postmitotske celice kuboidne oblike z močno alkalno fosfatazno aktivnostjo in sposobnostjo tvorbe mineraliziranega matriksa. Preosteoblasti so vmesna razvojna stopnja osteoblastov. Histološko so podobni osteoblastom ter izražajo alkalno fosfatazo, vendar imajo v nasprotju z osteoblasti omejeno sposobnost podvojevanja. Le okoli 10-20 % osteoblastov se vgradi v novo sintetizirani ekstracelularni matriks, kjer dosežejo najvišjo diferenciacijsko stopnjo osteoblastne linije ter postanejo osteociti. Osteociti so manjši kot osteoblasti, postmitotski, izgubijo nekatere citoplazemske organele in so relativno metabolno neaktivni. Značilna je zmanjšana proizvodnja ekstracelularnega matriksa ter alkalno fosfatazna aktivnost v primerjavi z osteoblasti (Aubin in sod., 1998). Nekateri avtorji so na osnovi biokemičnih markerjev definirali vmesno fazo med osteoblastom in osteocitom, ki so jo poimenovali osteocitični osteoblast (Bruder in Caplan, 1990; Wetterwald in sod., 1996).

Ekstracelularni kostni matriks (ECM) sestavljata organska in anorganska komponenta. Organski del je v večjem delu (90 %) sestavljen iz kolagena tipa I in drugih komponent, vključno s proteoglikani, različnimi nekolagenskimi proteini (osteopontin, kostni sialoprotein, osteokalcin, alkalna fosfataza) in rastnimi faktorji, ki so udeleženi v procesih celične diferenciacije, ter nalaganja in mineralizacije matriksa. Glavna anorganska (mineralna) komponenta je kalcijev fosfat v obliki hidroksiapatitnih kristalov. Eksperimentalno se nastanek ECM najbolj pogosto preverja s celičnim barvanjem Von Kossa ali Safranin O ter z merjenjem celokupne koncentracije kalcija.

Biokemični in molekularni markeji, s katerimi okarakteriziramo osteoblaste, so: membransko vezana alkalna fosfataza (AP), kolagen tipa I (KOL-I), osteokalcin (angl Osteocalcin, OCN), kostni sialoprotein (angl. Bone Sialoprotein, BSP), osteopontin (OPN), proteoglikani ter s paratiroidnim hormonom povezan peptidni receptor (PTH/PTHRP-R). AP ni specifična za kostno tkivo, vendar je visoko izražanje kostno-jetrno-ledvične različice alkalne fosfataze pomemben marker osteogeneze (Rodan in Rodan, 1988). KOL-I predstavlja okoli 90 % organskega deleža ekstracelularnega matriksa v zreli kosti in je primarni osteoblastni produkt med produkcijo ECM. KOL-I je prav tako izražen v preosteoblastni fazi, povečanje izražanja KOL-I pa se pojavi še pred povišanim izražanjem drugih molekul matriksa ter AP (Aubin in sod., 1998). OPN je fosfoglikoprotein, ki se nahaja predvsem v ECM kosti, sintetizirajo pa ga osteoblasti. Izražanje OPN ni značilno izključno za kostno tkivo, saj se ob stimulaciji lahko izraža tudi v neskeletnih tkivih. Študije so pokazale, da je zaznaven že v zgodnjih diferenciacijskih fazah pri proliferajočih prekurzorskih celicah, bolj izražen je pri preosteoblastih ter močno pri osteoblastih (**Slika 10**). V nasprotju z OPN je BSP značilen skoraj izključno za s skeletom povezane celice, t. j. hipertrofične hondrocite, osteobaste in osteocite (Bianco in sod., 1993). Trofoblastne celice v placenti so edino znano neskeletno mesto sinteze BSP (Bianco in sod., 1991). BSP je najbolj močno izražen pri osteoblastih, možno pa ga je zaznati tudi pri nekaterih preosteoblastnih regijah kosti (Bianco in sod., 1993) ter prehodno pri zgodnih predniških celicah (**Slika 10**). OCN ali kostni Gla protein je glavni nekolageni protein kosti, močno je izražen pri zrelih osteoblastih ter šibko v megakariocitih iz kostnega mozga (Thiede in sod., 1994). OCN je najbolj specifični marker osteogeneze, izražen je samo v post-mitotičnih osteoblastih ter ni izražen v preosteoblastih (**slika 10**). Cbfa-1/Runx-2 je transkripcijski faktor, ki se aktivira, ko nastopi osteogeneza in velja za robusten marker

osteogene zavezosti(Ducy, 2000). Za osteoblaste je značilno tudi izražanje nekaterih hormonskih receptorjev, kot je PTH/PTHrP-R (Lee in sod., 1993).



Slika 10: Koraki v osteogeni diferenciaciji v celični kulturi skozi spremembe izražanja nekaterih osteogenih označevalcev. – pomeni, ni izmerjene ekspresije markerja, -/+ do +++ naraščanje ekspresije od zgodnje detekcije do zelo visoke, - → +++ je heterogena ekspresija pri individualnih celicah (Aubin, 1998: 902)

2.5.5.2 Potek hondrogene diferenciacije MSC

Hondrogeneza se prične z agregacijo in kondenzacijo mezenhimskega celice. Najbolj značilne molekule za ta zgodnji korak so kolagen tipa II (KOL-II), N-kadherin ter transkripcijski faktor Sex Determining Region X-box (Sox-9). V nadaljevanju hondrogeneze celice začnejo proizvajati s KOL-II in z agrekanci bogat ekstracelularni matriks. Za naslednjo fazo je značilna intenzivna proliferacija celic, kjer nastanejo večji hrustančni skupki. Celice v središču vsakega skupka postopoma izstopajo iz celičnega skupka ter preidejo v fazo hipertrofične diferenciacije (maturacije). Med to fazo se hondroci povečajo, dokončno diferencirajo, mineralizirajo in postopoma preidejo v apoptozo. Po propadu celic preostali ekstracelularni matriks služi kot ogrodje za nadaljnjo nalaganje matriksa (Zuscik in sod., 2008).

2.5.5.3 Potek adipogene diferenciacije MSC

Maščobne celice (adipociti) izvirajo iz multipotentnih matičnih celic mezodermalnega izvora. Adipogeneza je zapleten večstopenjski proces, ki ga lahko razdelimo v dve glavni fazi: usmeritveno fazo in končno diferenciacijsko fazo. V prvi fazi multipotentne MSC postanejo usmerjene v adipogeno linijo in izgubijo multipotenten značaj. Usmerjeni

preadpociti so morfološko neločljivi od ostalih predniških celic. V končni diferenciacijski faziji se preadipociti, ki so fibroblastne oblike, spremenijo v bolj okrogle zrele adipocite, ki lahko sintetizirajo in skladiščijo lipide, izločajo za adipocite-specifične beljakovine ter so občutljivi na inzulin (Muraganandan in sod., 2009).

Proces uravnavajo različni transkripcijski faktorji, med katere spadajo tudi CCAAT ojačevalec/vezni protein δ , β , in α in s peroksisomsko proliferacijo aktiviran receptor γ (angl. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ , PPAR γ). PPAR γ je najpomembnejši regulator adipogeneze, saj v njegovi odsotnosti adipogena diferenciacija ni mogoča. Ektopično izražanje PPAR γ povzroči adipocitno diferenciacijo pri mnogih celičnih tipih, ki se normalno ne razvijejo v adipogeno linijo (Tontonoz in sod., 1994). Za diferenciacijo MSC iz kostnega mozga je značilno zelo močno povisano izražanje PPAR γ med adipogenezo. Izražen PPAR γ nato aktivira večino z adipogenezo povezanih genov, med katere spada maščobno kislinska sintaza in glukozni transporter 4, acetil CoA karboksilaza in inzulinski receptor (Muraganandan in sod., 2009).

2.5.5.4 Uporaba celičnih nosilcev pri diferenciaciji celic

Celični nosilec predstavlja tridimenzionalno ogrodje in omogoča primerno okolje za rast, diferenciacijo in migracijo celic ter spodbuja osteogeno in hondrogeno diferenciacijo. Visoke celične gostote na nosilcu spodbujajo tvorbo mineraliziranega matriksa, saj se tudi v osteohondralnem razvoju *in vivo* osifikacijski centri začnejo na mestu mezenhimske celične kondenzacije (Fröhlich in sod., 2009). V nadaljevanju bomo bolj podrobno obravnavali nosilce, ki se uporabljajo v tkivnem inženirstvu kostnega tkiva.

Zahteve pri oblikovanju idealnega nosilca za celice so: nosilec mora biti biokompatibilen ter biorazgradljiv, njegovi razgradni produkti pa ne smejo biti toksični za celice ali imunogeni. Časovni interval, potreben za razgradnjo nosilca, mora sovpadati s hitrostjo nastajanja nove kosti. Pomembna je tudi visoka poroznost nosilca, ki je potrebna za učinkovito nasaditev celic na nosilec (*in vitro*) ter migracijo celic iz tkiv v nosilec (*in vivo*), transport hranil in vaskularizacijo. Nosilec mora biti mehansko stabilen ter imeti mehanske lastnosti, podobne naravnim kostim. Idealen nosilec je tudi osteokonduktiven – spodbuja pritrditev, rast in sintezo ekstracelularnega matriksa na nosilcu, osteoinduktiven – spodbuja diferenciacijo matičnih celic v osteogene celice ter osteointegrativen – trajno in funkcionalno se spoji z že obstoječo kostjo (Logeart-Avramoglou in sod., 2005).

Materiale, ki se najbolj pogosto uporabljajo v tkivnem inženirstvu kosti, lahko razdelimo v tri skupine: polimeri, keramike in sestavljeni materiali (**Preglednica 6**).

Preglednica 5: Različni tipi nosilcev, ki se uporabljajo v tkivnem inženirstvu kosti

POLIMERI	KERAMIKE	SESTAVLJENI MATERIALI
<u>Naravni:</u> decelulariziran kostni matriks, kolagen I, fibrin, hitozan <u>Sintetični:</u> polimlečna kislina (PLA), poliglikolna kislina (PGA), polimlečna glikolična kislina (PLGA), polianhidridi, polikarbonati, polifosfazi, polikaprolaktoni (PCL), polifumarati	<u>Naravna:</u> korale <u>Sintetične:</u> hidroksiapatit (HA), hidroksiapatit-trikalcijev fosfat	Kolagen-HA-PLGA, hitozan-HA, PLA-PEG, kolagen-PLA-HA, PCL-HA

Glavne prednosti nosilca iz decelularizirane kosti, ki smo ga uporabili v naši študiji, so: »idealna« molekularna sestava, odlične strukturne in mehanske lastnosti, omogoča razvoj kosti *in vitro* in takojšnjo mehansko podporo po implantaciji konstrukta v predele telesa, ki so izpostavljeni pritiskom. V organski fazи nosilca se nahajajo ohranjene osteoinduktivne molekule (kolagen, BMP), ki delujejo kot modulatorji osteogene diferenciacije. Nosilci, ki imajo pore velike 200-900 µm, posnemajo strukturo kosti in omogočajo celično penetracijo, nastanek ekstracelularnega matriksa in postopno vaskularizacijo (Fröhlich in sod., 2009).

2.6 PRIMERJAVA EMBRIONALNIH IN MATIČNIH CELIC ODRASLEGA

V **Preglednici 7** so povzete nekatere razlike med matičnimi celicami odraslega ter embrionalnimi matičnimi celicami.

Preglednica 6: Glavne razlike med matičnimi celicami iz odraslih tkiv ter embrionalnimi matičnimi celicami (Bongso in Richards, 2004: 838)

Matične celice odraslega	Embrionalne matične celice
Populacije celic v organih so majhne, izolacija je težka, mesta nahajanja celic pa so pogosto težko dostopna	Ko jih izoliramo iz notranje celične mase blastociste, jih lahko namnožimo do velikega števila
Celične linije ne obstajajo	Celične linije obstajajo, preprosto namnoževanje celic po protokolu do zadostnega števila
Multipotentne	Pluripotentne
Omejena zmožnost podvojevanja (pri visokih pasažah pride do kariotipskih sprememb)	Neomejena zmožnost podvojevanja (kariotipske spremembe so redke in so lahko posledica podaljšanega gojenja pri visoki gostoti)
Nizka telomerazna aktivnost	Visoka in konsistentna telomerazna aktivnost
S staranjem prihaja do skrajševanja dolžine kromosomov	Kromosomi se ne krajšajo
Zgodnja apoptoza	Pozna apoptoza
Sprememba genotipa ni mogoča	Spremembna genotipa mogoča z metodo prenosa somatskega jedra
Ni možnosti nastanka teratomov	Možnost nastanka teratomov po implantaciji
Epigenetske genetske spremembe so nepovratne	So povratne
Ni etičnih zadržkov pri uporabi celic	Etični zadržki, ki se razlikujejo glede na državo in inštitucijo
Uporaba: transplantacijske celične terapije	Uporaba: (1) celična terapija, (2) testiranje farmacevtskih učinkovin, (3) študije embrionalnega razvoja, razvojnih napak ter rakavih obolenj pri otrocih (4) proizvodnja gamet in zarodkov

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Celice

Predniške celice (hESC-P) so bile pridobljene iz embrionalnih matičnih celic linije H9 iz inštituta Wicell (Wisconsin). Podatki o celični liniji H9 so dostopni na spletni strani inštituta (WA09..., 2009). Diferenciacija konfluentne kulture linije H9 je bila inducirana s 7-dnevno inkubacijo v mezodermalnem gojišču. Celice smo nato presadili in jih gojili, kot je opisano v poglavju 3.2.1.

Mezenhimske matične celice iz kostnega mozga (1M-125 Human Bone Marrow, Fresh 25 ml) in humane fibroblaste (CC-2511 NHDF-Ad-Der Fibroblasts FGM-2, cryo amp) smo kupili pri podjetju Lonza (Basel, Švica).

Vse uporabljene celice smo gojili do 5. pasaže in ugotavljali njihov diferencijski potencial.

3.1.2 Kemikalije

Preglednica 7: Seznam kemikalij, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu

Okrajšava	Celo ime	Podjetje	Kataloška št. proizvoda
100 % Etanol	Absolutni etanol; za molekularno biologijo	Sigma	E7023
2-merkaptoetanol	2-merkaptoetanol ali β-merkaptoetanol	Invitrogen	21985-081
3-IBMX	3-izobutil-1-metilksantin	Sigma	170018
Aceton	Aceton	Sigma-Aldrich	179124
Alciansko modrilo	Alciansko modrilo 8GX, prah	Sigma	A5268
Blyscan™ komplet za merjenje glikozaminoglikanov	Blyscan™ komplet za merjenje sulfatiziranih glikozaminoglikanov	Biocolor	B1000
Calcium (CPC) Liquicolor komplet	Komplet za določanje celokupne koncentracije kalcija	Stanbio Laboratory	0150-250
Citrisol	Citrisol	Quality Chemical Company	QCC-564
Dex	Deksametazon; vodotopen in testiran za celične kulture	Sigma	D2915
DMSO	Dimetil sulfoksid	Sigma-Aldrich	D2438
Dnase I	Komplet za razgradnjo genomske DNA v RNA vzorcih	Invitrogen	18068
DPBS	Slana fosfatna puferska raztopina (angl. Phosphate Buffered Saline) brez MgCl ₂ in CaCl ₂	Invitrogen	14190
Etanol	Etanol 200 proof, brez DNaz in RNaz	Sigma - Aldrich	E7023
Formaldehid	Raztopina formaldehida, 3,7 %	Sigma-Aldrich	533998

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Hematoksilin	Mayerjeva raztopina hematoksilina	Sigma-Aldrich	MHS-1
HG-DMEM	Dubeccovo modificirano gojišče (angl. Dulbecco's modified eagle medium) - bogato z glukozo (angl. high glucose)	Invitrogen	21985-023
HyClone FBS	"HyClone" fetalni telečji serum (angl. Bovine Fetal Serum »)- definiran; LOT#ATK33398	THERMO Scientific	SH30070.03
Indometacin	Indometacin	Sigma-Aldrich	17378
Inzulin	humani rekombinantni inzulin	Sigma-Aldrich	I0259
ITS-X	Inzulin-transferin-selen-X suplement	Invitrogen	51500-056
Izopropanol	2-propanol ali izopropil alkohol; za molekularno biologijo	Sigma-Aldrich	59304
Kloroform	Kloroform; za molekularno biologijo	Fisher Scientific	BP1145-1
KO-DMEM	Knockout™ Dulbeccovo modificirano gojišče (angl. Knockout™ Dulbecco's modified eagle Medium)	Invitrogen	10829
Komplet za določanje aktivnosti alkalne fosfataze	Komplet za levkocitno alkalno fosfatazo (na osnovi naftol AS-MX fosfata in "fast blue RR" soli s citratom)	Sigma-Aldrich	85L2-1KT
Komplet za reverzno transkripcijo RNA v cDNA	angl. Superscript III first strand synthesis for RT-PCR	Invitrogen	18080-051
Komplet za RT-PCR	Komplet za reverzno transkripcijo (angl. SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR)	Invitrogen	18080-051
L-AA-2-P	L-askorbinska kislina-2-fosfat seskvimagnezijev solni hidrat	Sigma-Aldrich	A8960
L-glutamin	L-glutamin	Invitrogen	25030-081
LIVE/DEAD® komplet	LIVE/DEAD® komplet za določanje viabilnosti celic	Invitrogen	L3224
L-prolin	L-prolin, neživalskega izvora, testiran za delo s celičnimi kulturnami	Sigma	P5607
MEM NEAA	Neesencialne aminokisline	Invitrogen	11140
Natrijev azid	Natrijev azid	Riedel-de Haën	13412
Natrijev piruvat	100 mM raztopina natrijevega piruvata	Invitrogen	11360-070
Nuclear Fast Red	Jedrno rdeče barvilo, raztopina	Sigma-Aldrich	59304
Oil Red O	Oil Red O barvilo, prah	Sigma-Aldrich	59304
PBS 10X	Slana fosfatna puferska raztopina (angl. Phosphate Buffered Saline"), 10-krat koncentrirana, brez MgCl ₂ in CaCl ₂	Invitrogen	70011-044
Pen-Strep	Penicilin in Streptomycin	Invitrogen	15140
Permount	"Mounting" medij	Fisher Scientific	SP15-500

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Proteinaza K	Serinska proteinaza širokega spektra	Fischer BioReagents	BP1700-100
Quant-iT Picogreen	Komplet za določanje koncentracije dvoverižne DNA (angl. Quant-iT PicoGreen dsDNA kit)	Invitrogen	P7589
Quant-iT RNA Assay Komplet	Komplet za kvanitifikacijo RNA v vzorcih	Invitrogen	Q32855
Rnase Zap	Sprej za odstranitev RN-az s plastičnih in steklenih površin	Ambion	AM9780
RPMI	angl. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medij (brez fenola)	Gibco	11835
Srebrov nitrat	Srebrov nitrat, ACS reagent, >99 %	Sigma-Aldrich	209139
Trikloroocetna kislina	Raztopina trikloroocetne kisline, 6.1.N	Sigma-Aldrich	59304
Tripan	Tripansko modriilo (angl. Trypan Blue Solution (0,4 %))	Sigma-Aldrich	59304
Tripsin	25 % raztopina tripsina v EDTA	Invitrogen	25200
Triton	Triton-X-100	Sigma-Aldrich	X100-500ML
TRIzol reagent	Trizol® LS reagent za izolacijo RNA	Invitrogen	10296-028
Voda	Voda, sterilno filtrirana, testirana za delo s celičnimi kulturami	Sigma	W3500
Želatina	Želatina iz svinjske kože, tip A, v prahu, testirana za delo s celičnimi kulturami.	Sigma	G1890
β-GP	beta-glicerofosfat	Sigma-Aldrich	59304

3.1.3 Aparature in plastični pripomočki

Preglednica 8: Seznam glavnih aparatur in plastičnih pripomočkov, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu

Aparatura	Podjetje
Aparatura za PCR v realnem času, model HT7900	Applied Biosystems
Aparatura za PCR, model MyCycler	BioRad
Avtoklav, model 2540E	Tuttnauer Brinkmann
Avtomatske pipete 1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf
Centrifuga, model 5415R	Eppendorf
Centrifuga, model 5804R	Eppendorf
Fazno kontrastni fluorescenčni mikroskop, model IX 81	Olympus
Fluorimeter Quibit	Invitrogen
Fluorometer, model FL x 800	BioTek
Hladilnik z zamrzovalnim predelom, model REVCO	Thermo Scientific
Inkubator Heracell 150	Thermo/ Fischer Scientific
Multikanalna avtomatska pipeta 30-300 µl	Thermo
Pipetor	Accu-jet ® pro

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Spektrofotometer SpectraMax Plus	Molecular Devices
Svetlobni mikroskop model TMS-F	Nikon
Števna komora	Hausser Scientific, kataloška številka: 3200
Vibracijsko mešalo	Fischer Scientific

3.1.4 Gojiča in ostale raztopine

Preglednica 9: Seznam in sestava uporabljenih gojič pri raziskovalnemu delu

Ime gojiča	Sestava
Adipogeno gojič	<i>Indukcija adipogeneze:</i> 90 % HG-DMEM, 10 % HyClone FBS, 1 % PenStrep, 1 µM Dex, 10 µg/ml Inzulin, 200 µM Indometacin, 500 µM IBMX <i>Vzdrževanje adipogeneze:</i> 90 % HG-DMEM, 10 % HyClone FBS, 1 % PenStrep, 10 µg/ml inzulin
Hondrogeno gojič	HG-DMEM, 1 % PenStrep, 100nM Dex, 50 µg/ml AA-2-P, 40 µg/ml L-prolin, 1xITS, 1 mM Natrijev piruvat, 10 ng/ml TGF-β3
Kontrolno gojič	90 % HG-DMEM, 10% HyClone FBS, 1 % PenStrep
Mezodermalno gojič	80 % KO-DMEM, 20 % HyClone FBS. Dodatki: 2,5 ml neesencialnih AK, 1,25 ml L-glut, 500 µl β-mercaptopetanol, 2,5 ml Pen Strep (količine za 200 ml medija)
Osteogeno gojič	90 % HG-DMEM, 10 % HyClone FBS, 1 % PenStrep, 1µM Dex, 10 mM β-GP , 50 µM AA-2P

Preglednica 10: Uporabljene raztopine pri raziskovalnemu delu

Ime raztopine	Koncentracija
Raztopina tripsina	0,25 %
Raztopina kolagenaze	1 mg/ml v TEX pufru
Raztopina želatine	0,1 % v vodi za celične kulture

3.1.5 Reagenti in pripomočki za PCR v realnem času

Preglednica 11: Seznam reagentov in pripomočkov za merjenje izražanja genov z metodo PCR v realnem času

Proizvod	Podjetje	Kataloška številka
GAPD endogena kontrola	Applied Biosystems	4310884E
PPARγ komplet	Applied Biosystems	HS01115513-M1
CBFA-1 (RUNX-2) komplet	Applied Biosystems	HS00231692
optična plošča za qPCR s 96-luknjami	Applied Biosystems	4306737
Taqman® univerzalna PCR mešanica	Applied Biosystems	4304437
Adhezivna folija za PCR ploščo	Applied biosystems	4360954

3.2 METODE

3.2.1 Metode dela s celičnimi kulturami

3.2.1.1 Odmrzovanje celic

Celice je potrebno odmrzniti hitro, saj medij za zamrzovanje vsebuje dimetilsulfoksid (DMSO), krioprotektor, ki pa je pri sobni temperaturi močno toksičen za celice. Postopek odmrzovanja celic smo izvedli v naslednjih korakih:

- a) Celice vzamemo iz posode s tekočim dušikom. Predhodno določimo njihovo lokacijo v posodi z dušikom s pomočjo dnevnika zamrzovanja, kamor sproti zapisujemo, kdaj in katere celice smo zamrznili in kje se le-te nahajajo (stojalo, nivo).
- b) Krioviali narahlo odvijemo pokrovček in na ta način omogočimo izhajanje plina iz viale. Pokrovček nato zapremo nazaj in prenesemo vialo s celicami v vodno kopel. Celice na hitro odtajamo v vodni kopeli pri 37 °C. Odtajanje skrbno opazujemo in ko se ledeni kristal v viali zmanjša na velikost 1-2 mm, vialo obrišemo z etanolom in jo prenesemo v brezprašno komoro.
- c) Vialo s celicami v brezprašni komori še enkrat obrišemo z etanolom okoli pokrovčka, odpremo in s pomočjo pipete celice prenesemo v centrifugirko.
- d) Po kapljicah dodamo 14 ml ogretega gojišča.
- e) Celično suspenzijo centrifugiramo 5 min pri 250 x g.
- f) S pomočjo aspiratorja odsesamo medij (pri tem koraku tudi dokončno odstranimo DMSO).
- g) Celice resuspendiramo v primernem volumnu gojišča in jih v željeni koncentraciji nasadimo na gojilne posodice. Za presajanje celic smo uporabljali kontrolno (za BMSC in NHF) in mezodermalno gojišče (za hESC-P).

3.2.1.2 Gojenje in presaditev celic

Celice smo gojili v gojilnih posodah z različnimi površinami. Večje posode (T75, T125) smo uporabljali za namnoževanje celic do zadostnega števila, potrebnega za poskus, ter za ugotavljanje dinamike rasti, manjše posode (plošča s 24 luknjami) pa za testiranje različnih diferencijskih gojišč v samem eksperimentu. Celicam smo menjevali medij na vsake 3-4 dni. Vsak dan smo s pomočjo mikroskopa opazovali konfluentnost celic. Ko se je preraščenost gojilne posode približala 100 %, smo celice presadili. Tako menjavo gojišča kot presaditev celic smo izvajali v brezprašni komori, v aspetičnih pogojih.

Postopek presaditve celic (količinsko prirejen za gojilno posodo s površino 150 cm²):

- a) S pomočjo aspiratorja odsesamo staro gojišče iz gojilne posode.
- b) Celice speremo z 20 ml DPBS, ki ne vsebuje magnezijevih in kalcijevih ionov, in s tem razrahljamo pritrđitev izvenceličnih proteinov.
- c) Celice prekrijemo z 8 ml tripsina. Tripsin je proteinaza, ki razrahlja medcelične stike in omogoči odlepljanje celic od površine gojilne posode.
- d) Celice inkubiramo 5 min pri 37 °C.
- e) Pod mikroskopom pregledamo, če so se celice popolnoma odlepile od gojilne posode.
- f) Celice prenesemo nazaj v brezprašno komoro in jim dodamo enak volumen svežega gojišča (vsebuje fetalni telečji serum), s čimer inaktiviramo delovanje tripsina.
- g) Celično suspenzijo prenesemo v centrifugirko in centrifugiramo 5 min pri 250 x g.
- h) Odsesamo medij in s tem dokončno odstranimo tripsin. Celičnemu peletu najprej dodamo 10 ml svežega medija ter ga s pipetiranjem dobro resuspendiramo, da

razbijemo skupke celic, nato pa dodamo še 10 ml svežega medija in še enkrat dobro premešamo.

- i) Odvzamemo vzorec homogene celične suspenzije ter celice preštejemo pod mikroskopom s pomočjo števne komore.
- j) Celice resuspendiramo v željenem volumnu gojišča in nasadimo na površino gojilne posode v ustrezni gostoti. hESC-P smo nasajevali v gostoti 10.000 celic/cm², BMSC in NHF pa v gostoti 5000 celic/cm².

3.2.1.3 Zamrzovanje celic

Celice zamrzujeme počasi, običajno s hitrostjo 1 °C/min. Medij za zamrzovanje vsebuje DMSO, krioprotektant, ki upočasni zamrzovanje in tako nastajanje vodnih kristalov, ki bi lahko poškodovali celično membrano in organele ter tako povzročili celično smrt.

Postopek zamrzovanja celic:

- a) Pripravimo medij za zamrzovanje: V razmerju 1 : 4 zmešamo DMSO z ohlajenim FBS.
- b) Označimo krioviale s tipom celic, pasažo, koncentracijo in datumom zamrzovanja.
- c) Celice v gojišču resuspendiramo do primerne gostote (npr. 2 milijona/ml).
- d) Po kapljicah dodajamo celični suspenziji medij za zamrzovanje do razmerja 1:1 ter porazdelimo celično suspenzijo v krioviale (po 1 ml v vsako kriovalo).
- e) Viale prenesemo v posodo za zamrzovanje, ki vsebuje izopropanolin, in omogoča zamrzovanje s hitrostjo 1 °C/min.
- f) Posodo postavimo v zamrzovalnik pri -80 °C.
- g) Po 24 urah viale z zamrznjenimi celicami prestavimo v tekoči dušik.

3.2.2 Namnoževanje celic in ugotavljanje dinamike rasti hESC-P

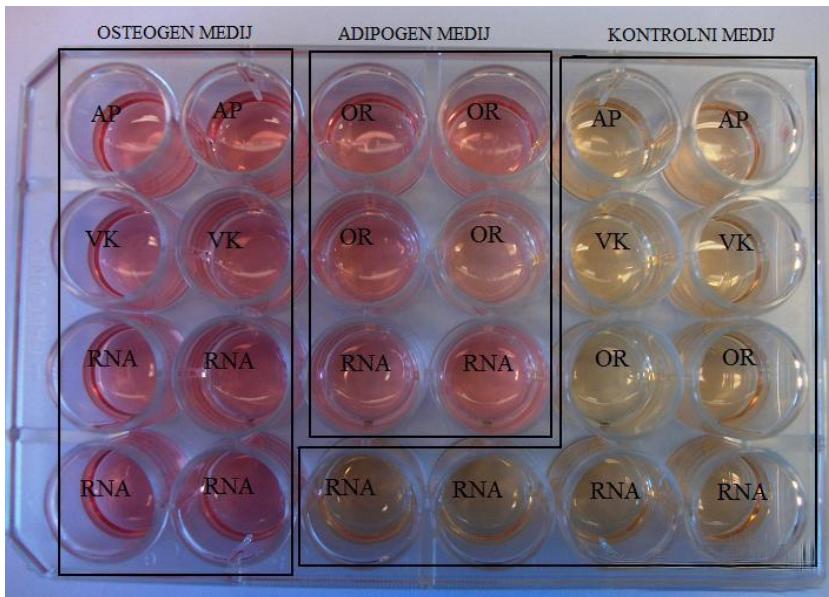
Za pričetek poskusa smo potrebovali zadostno število celic, zato smo odmrznjene hESC-P P3 namnoževali v mezodermalnem gojišču. Celice smo nasadili na z želatino prekrite gojilne posodice s površino 150 cm² pri gostoti 10.000 celic/cm². Ko so celice prerasle površino gojilne posodice, smo jih tripsinizirali in nasadili na nove gojilne posode v enaki začetni koncentraciji. Tudi ko smo že dosegli dovolj veliko število celic, potrebnih za poskus, smo z gojenjem celic nadaljevali do 12. pasaže, saj smo želeli opazovati, kako se spreminja hitrost rasti in morfologija celic skozi podaljšano gojenje. V nadaljevanju smo zaradi manjše porabe gojišča gojili celice le v dveh posodicah s površino 150 cm², presežek celic pa smo po tripsinizaciji zavrgli ali zamrznili. Celice smo med rastjo slikali in primerjali njihovo morfologijo pri različnih pasažah ter konfluencah.

Za potrebe poskusa smo do zadostnega števila namnožili tudi BMSC dveh različnih donorjev (pozitivna kontrola) ter NHF (negativna kontrola). Celice smo nasadili pri začetni gostoti 5000 celic/cm². Za namnoževanje BMSC in NHF smo uporabljali kontrolno gojišče, gojilnih posod pa predhodno nismo prekrili z želatino. Za uporabo dveh tipov BMSC smo se odločili, ker smo želeli opazovati tudi vpliv darovalca na diferenciacijski potencial BMSC.

3.2.3 Diferenciacija celic v monoslojih

Za gojenje v monoslojih smo uporabili gojilne plošče za celične kulture s 24 luknjami. Celice smo na dan pričetka poskusa nasadili na plošče v začetni koncentraciji 10.000 celic/cm². Za vsak tip celic (hESC-P., BMSC1, BMSC 2 in NHF) smo pripravili po 4

plošče, ki smo jih označili s teden 1, teden 2, teden 3 in teden 4. Celice smo pred nasaditvijo na plošče resuspendirali v treh različnih gojiščih: osteogenem, adipogenem in kontrolnem gojišču ter jih razporedili v luknje po naslednji shemi:



Slika 11: Razporeditev na plošči za poskus diferenciacije celic v monoslojih

Po 1., 2., 3. in 4. tednu kultivacije smo preverjali aktivnost encima alkalna fosfataza (AP), izvedli barvanje Von Kossa (VK) in barvanje Oil red O (OR) ter odvzeli vzorce za kasnejšo izolacijo RNA za analize izražanja genov z RT-PCR. Ker je alkalna fosfataza encim, bi ga fiksacija v formaldehidu inaktivirala, zato smo preverjali njegovo aktivnost sproti na vzorcih, fiksiranih z citratnim purom acetona (60 %) 30 sekund. Vzorce za barvanje Von Kossa in Oil Red O smo sprali s PBS ter 30 min fiksirali v 3,7 % formaldehidu, nato pa hranili v 0,5 ml PBS do barvanja. Vzorce za analizo RNA smo pripravili tako, da smo iz lukanj naprej odsesali medij, nato pa celice sprali s PBS. Celice smo s pomočjo nastavkov za pipetiranje postrgali s površine v 300 µl PBS ter prenesli v mikrocentrifugirko. V eno mikrocentrifugirko smo združili vzorca iz dveh lukanj (600 µl). Po centrifugirjanju pri 300 x g 5 min smo odstranili supernatant, dodali 0,5 ml TRIzol® reagenta ter vzorce dobro premešali na mešalu. Do nadaljnje izolacije smo vzorce, raztopljene v TRIzol® reagentu, hranili pri -20 °C.

3.2.4 Priprava in diferenciacija celic v kulturah peletov

Postopek priprave peletov: Celično suspenzijo smo pridobili iz monokultur s tripsinizacijo. Alikvote po 300.000 celic, suspendiranih v 1ml medija, smo centrifirali pri 300 x g 5 min v epruvetkah volumna 1.5 ml s konusom in pokrovčkom na navoj. Po 24 urah gojenja v inkubatorju so celice tvorili kompaktne celične skupke, ki niso bili pritrjeni na plastiko. Kulturam peletov smo medij popolnoma zamenjali vsake 3-4 dni.

V kulturah peletov smo preverjali osteogen in hondrogen potencial hESC-P, saj je znano, da tridimenzionalno okolje spodbuja diferenciacijo matičnih celic v osteogen in hondrogen fenotip. Pozitivna kontrola so bile matične celice iz kostnega mozga (BMSC) dveh različnih darovalcev, negativna kontrola pa normalni človeški fibroblasti (NHF). Vse tri

celične tipe smo gojili v kontrolnem, osteogenem in hondrogenem gojišču 4 tedne. Po 4 tednih kultivacije smo pelete sprali s PBS (-Mg²⁺, -Ca²⁺) in jih do nadalnjih biokemijskih analiz shranili pri -80 °C. Iz vsake skupine smo 4 vzorce fiksirali v 3,7 % formaldehidu ter vpeli v histogel in jih poslali na oddelek za histologijo, kjer so naredili histološke rezine, ki smo jih pobarvali Von Kossa (VK) za prisotnost kalcija in z alcianskim modrilmom (angl. Alcain Blue, AB) za prisotnost glikozaminoglikanov (GAG). 6 peletov iz vsake skupine smo uporabili za merjenje DNA in GAG, preostalih 6 peletov iz vsake skupine pa za merjenje koncentracije kalcija.

3.2.5 Metode za določanje števila celic

3.2.5.1 Štetje s tripanskim modrilmom

Teorija: Tripansko modrilo je diazo barvilo, ki zaradi svojih kemičnih lastnosti prehaja samo v membrane mrtvih celic, membrane živih celice pa ostanejo neprepustne za modrilo. Pod mikroskopom mrtve celice vidimo difuzno modro, žive pa ostanejo jasno bele.

Pripravili smo homogeno suspenzijo celic za štetje, nato pa smo celice v razmerju 1:1 pomešali s tripanskim modrilmom. Če je bilo potrebno, smo vzorec celic predhodno razredčili v PBS. Celice smo nanesli pod krovno steklo hemocitometra, ki je sestavljen iz dveh števnih komor. Vsaka števna komora je sestavljena iz 9 kvadratnih vdolbin z volumnom po 1 µl (površina je 1 mm²). Celice smo prešteli pod svetlobnim mikroskopom ter nato izračunali celokupno število po formuli: celokupno število celic v vzorcu = št. preštetih celic/število prestetih kvadratov*2*R*10^{4*} V_{vzorčene raztopine}. R pomeni redčitev vzorčne suspenzije v PBS (če je le-to potrebno), za faktor 2 pa pomnožimo zaradi redčitve vzorca v tripanu, ki je v razmerju 1:1.

3.2.5.2 Določanje koncentracije DNA v vzorcih

Koncentracija DNA odraža število celic v peletih in konstruktih, nasajenih s celicami. V konstruktih smo merili DNA za ugotavljanje uspešnosti nasajevanja celic na nosilec, pri čemer smo primerjali količino DNA v začetni suspenziji celic s količino DNA v nosilcu po nasaditvi.

Teorija: Koncentracijo DNA smo določali s kompletom Quant-iT™ PicoGreen®. Quant-iT™ PicoGreen® je občutljivo fluorescentno barvilo za kvantifikacijo dvooverižne DNA v raztopini. Fluorescentno barvilo je specifično za DNA in se ne veže na RNA in ostale molekule.

Potek dela

a) Razgradnja vzorcev s kolagenazo:

Vzorce smo čez noč inkubirali v 0,1 mg/ml raztopini Proteinaze K v pufru TE (10 mM TRIS, 1mM EDTA, 0,1 % Triton) v vodni kopeli pri 50 °C.

b) Priprava znanih koncentracij DNA za pripravo umeritvene krivulje:

Pripravili smo 1µg/ml založno raztopino dvooverižne DNA v TE. Pripravili smo redčitve standardne DNA, ki so ustrezale koncentracijam 0 ng/ml, 50 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml, 700 ng/ml in 1000 ng/ml.

c) Analiza vzorcev:

Vzorce smo po inkubaciji v prisotnosti kolagenaze dobro homogenizirali s pomočjo mlinčka, jih močno premešali na mešalu in centrifugirali na 500 x g 5 min, da so se celični ostanki dobro posedli. DNA se je nahajala v vodni raztopini. Supernatant smo redčili v pufru TE 5 krat. S tem smo dosegli, da so bile izmerjene absorbance znotraj vrednosti umeritvene krivulje. 100 µl lizata/standarda smo odpipetirali v ploščo s 96 luknjami in dodali 100 µl fluorescentnega reagenta. Fluorescenti reagent smo sveže pripravili tako, da smo zmešali Quant-iTTM PicoGreen® dsDNA reagent s pufrjem TE v razmerju 1 : 200. Ploščo smo inkubirali v temi 3 minute ter nato izmerili fluorescenco na fluorometru (eksitacija: 480 nm, emisija: 520 nm).

3.2.6 Citokemični test za ugotavljanje aktivnosti encima alkalna fosfataza

Teorija: Alkalna fosfataza je protein na površini celic. S celično membrano je povezan preko fosfatidilinozitol fosfolipidnega kompleksa. Visoka aktivnost alkalne fosfataze v vzorcu je povezana z aktivno formacijo mineraliziranega matriksa. Substrat pri citokemičnem testu je naftol AS-MX fosfat. Aktiven ancim alkalna fosfataza v celicah odceplja fosfatni ion od substrata. Naftol AS-MX se poveže z barvilo »Fast blue«; rezultat je vijolična barva na mestih, kjer je prisotna celična aktivnost alkalne fosfataze. V primerjavi z osteogeno je kontrolna skupina obarvana mnogo manj intenzivno.

Postopek: Za merjenje aktivnosti alkalne fosfataze smo uporabljali komplet za merjenje alkalne fosfataze podjetja Sigma-Aldrich.

a) Priprava reagentov:

- Delovna raztopina citratnega pufra: Razredčimo 2 ml koncentrirane raztopine citratnega pufra s 100 ml deionizirane vode.
- Raztopina za fiksacijo (60 % citratni pufer v acetonu): pri konstantnem mešanju dodamo 2 volumna delovne raztopine citratnega pufra 3 volumnom acetona.
- Raztopina diazonijeve soli: s pomočjo magnetnega mešala raztopimo vsebino »Fast Blue RR« solne kapsule v 48 ml distilirane vode. V naslednjem koraku dodamo 2 ml naftol AS-MX fosfat alkalne raztopine in premešamo.
- b) Celice 30 sekund fiksiramo z mešanico citratnega pufra v acetonu. Pri tem koraku je potrebna previdnost, saj predolga izpostavljenost fiksacijskemu sredstvu lahko uniči delovanje alkalne fosfataze. Celice previdno spiramo z deionizirano vodo 45 sekund. Med koraki ne smemo dovoliti, da bi se celice osušile.
- c) Dodamo raztopino diazonijeve soli in inkubiramo 30 minut pri 18-26 °C v temi. Po 30 minutah celice nežno spiramo z destilirano vodo 2 minutti.
- d) Celice za boljšo vidljivost pod mikroskopom obarvamo še z Mayerjevo raztopino hematoksilina. Inkubiramo 10 min in nato 3 minute spiramo v deionizirani vodi. Rezultat tega barvanja je jasno obarvano jedro z rahlim ozadjem.
- e) Celice pokrijemo s plastjo deionizirane vode, da se ne izsušijo in pregledamo pod svetlobnim mikroskopom.

3.2.7 Merjenje celokupne koncentracije kalcija

Nalaganje kalcija pri formaciji ekstracelularnega matriksa (ECM) je indikator osteogene diferenciacije. Kalcij smo merili v peletih, ki smo jih gojili v osteogenem, kontrolnem in hondrogenem gojišču.

Teorija: Celokupno koncentracijo kalcija v kulturah peletov smo določali s kompletom Calcium (CPC) Liquicolor (Stanbio Laboratory). Metoda temelji na disociaciji kalcija iz izvenceličnega matriksa v kislo raztopino, v naslednjem koraku pa sproščen kalcij reagira z ortocresolftaleinskim kompleksom v alkalnem mediju, kar vidimo kot vijolično obarvanje in spektrofotometrično izmerimo pri valovni dolžini 550 nm. Količina kalcija v vzorcu je v določenem območju sorazmerna z intenziteto vijolične barve. Navzkrižna reakcija z magnezijem je onemogočena z 8-hidroksikinolinom, reakcija s težkimi kovinami pa je kontrolirana s natrijevim cianidom.

Postopek:

- a) S pipeto previdno odstranimo gojišče in pelet speremo s PBS, ki ne vsebuje magnezijevih in kalcijevih ionov.
- b) Vsakemu peletu dodamo 300 µl trikloroacetne kisline.
- c) Pelet dobro homogeniziramo z vibracijskim mešalom in inkubiramo 30 min pri sobni temperaturi.
- d) Vzorce centrifugiramo pri 3000 x g 5 min pri 4 °C in izmerimo koncentracijo kalcija v supernatantu.
- e) Priprava znanih koncentracij kalcija za umeritveno krivuljo:
pripravimo redčitve standarda ki so ustreza koncentracijam 0 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml in 80 µg/ml.
- f) Odpipetiramo po 10 µl vzorca/ standarda v prozorno mikrotitersko ploščo s 96 luknjami. V vzorcih, ki smo jih gojili v osteogenem mediju, pričakujemo višjo vsebnost kalcija, zato jih predhodno ustrezno razredčimo (10-krat), da so dobljene meritve znotraj obsega umeritvene krivulje.
- g) Sveže pripravimo raztopino reagenta za vezavo kalcija in puferskega reagenta za kalcij v razmerju 1:1. Za posamezno luknjo v plošči potrebujemo 100 µl raztopine.
- h) S pipeto odpipetiramo po 100 µl raztopine v vsako luknjo.
- i) Ploščo inkubiramo 5 minut v temi pri sobni temperaturi.
- j) Izmerimo optično gostoto v vsaki luknji plošče s spektrofotometrom, nastavljenim na valovno dolžino 550 nm.

3.2.8 Barvanje Von Kossa

Teorija: V fotokemični reakciji pride do zamenjave fosfatnih in karbonatnih ionov v vzorcu s srebrovimi. Vir srebra je srebrov nitrat. Za aktivacijsko energijo je potrebna močna bela ali ultravijolična svetloba. Ker so območja v tkivu, ki so bogata s karbonati in fosfati, nespremenljivo povezana z območji nalaganja kalcija, se metoda uporablja za demonstracijo nalaganja kalcijevih depozitov v tkivu.

Postopek:

- a) Celice speremo s PBS ter fiksiramo v 3,7 % formaldehidu v PBS pri sobni temperaturi 30 min. Celice do nadaljnje analize pokrijemo s PBS, da se ne izsušijo.
- b) Pred barvanjem celice speremo z deionizirano vodo.
- c) Vzorce prekrijemo s 5 % raztopino srebrovega nitrata ter izpostavimo močni beli svetlobi za 30 min. Zaradi boljšega odboja svetlobe podstavimo pod plošče s celicami aluminijevo folijo.
- d) Speremo z 1 ml deionizirane vode ter prekrijemo vzorce s 350 µl destilirane vode in pogledamo pod svetlobnim mikroskopom.

3.2.9 Barvanje z Oil Red O

Teorija: Barvilo Oil Red O se uporablja za identifikacijo adipocitov. Je v maščobi topno diazo barvilo (lizohrom) in barvanje temelji na predpostavki, da je barvilo bolj topno v maščobi kot v topilu, zato prehaja iz topila in se nalaga v maščobnih kapljicah adipocitov ter jih obarva v značilno rdečo barvo.

Priprava kemikalij:

- Založna raztopina Oil Red O – s pomočjo tople vodne kopeli raztopimo 0,25 g barvila v prahu Oil red O v 50 ml izopropanola.
- Delovna raztopina Oil Red O – razredčimo 15 ml založne raztopine z 10 ml distilirane vode, pustimo stati 10 min in nato prefiltriramo skozi papirni filter v stekleno čašo ter nemudoma pokrijemo. Delovna raztopina ni obstojna in jo moramo pripraviti vsakič sproti.

Postopek barvanja:

- a) Celice, ki smo jih predhodno fiksirali s 3,7 % formaldehidom 30 min, se nahajajo v PBS. Odstranimo PBS in jih speremo z vodo iz pipe.
- b) Sledi spiranje s 60 % izopropanolom.
- c) Celice obarvamo s sveže pripravljeno delovno raztopino barvila Oil Red O in inkubiramo 15 min pri sobni temperaturi.
- d) Spiramo najprej s 60 % izopropanolom ter nato še z destilirano vodo.
- e) Vzorce prekrijemo s plastjo vode, da se ne izsušijo, ter jih pregledamo pod mikroskopom.

3.2.10 Določanje koncentracije glikozaminoglikanov

Koncentracijo glikozaminoglikanov v vzorcih peletov smo določali s kompletom Blyscan™ proizvajalca Biocolor.

Teorija: 1,9-dimetilmelenskem modriliu se spremeni absorpcijski spekter, ko se le-ta poveže sulfatiranimi glikozaminoglikani (GAG, proteoglikani). Pri 540 nm izmerimo pozitivno spremembo, ki jo povzroči kompleks sulfatiranih glikozaminoglikanov z DMM. Pri 595 nm izmerimo negativno spremembo. Razlika med 595 in 540 nm nam da bolj natančen rezultat, kot če bi brali le pri eni valovni dolžini. Kompleks glikozaminoglikanov z dimetilen modrim barvilom po 5 minutah precipitira iz raztopine in plošča postane neberljiva, zato pohitimo z branjem plošče na spektrofotometru (Biocolor ...,1998).

Priprava reagentov:

- Dimetilensko modrilo
- a) Raztopimo 2g natrijevega formata v 980 ml deionizirane vode.
- b) Dodamo 2 ml formične kisline (n-butil format ali butil ester) in uravnamo pH na 3,5.
- c) V ločeni epruveti dodamo 16 mg dimetilen modrega k 5 ml etanola.
- d) Premešamo z vibracijskim mešalom.
- e) Dodamo raztopino barvila pufru, barvilo dokončno izperemo iz epruvete z deionizirano vodo.
- f) Razredčimo do 1 l, hranimo v hladilniku (4 °C).
- Standard: 1mg/ml hondroitin-6-sulfat

Postopek:

- a) DMM ogrejemo na sobno temperaturo.
- b) Pripravimo razredčitve standarda v koncentracijah: 0 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10 µg/ml, 12,5 µg/ml, 15 µg/ml, 17,5 µg/ml, 20 µg/ml, 22,5 µg/ml, 25 µg/ml in 30 µg/ml.
- c) Odpipetiramo 40 µl standarda/ vzorca v ploščo s 96 luknjami. Vsak vzorec/standard odpipetiramo v dveh ponovitvah.
- d) S pipeto dodamo 200 µl barvila DMM najprej k vzorcem in potem k standardom. Nemudoma izmerimo absorbanco pri dveh valovnih dolžinah (540 nm in 595 nm) in izračunamo koncentracijo sulfatiranih glikozaminoglikanov.

3.2.11 Izolacija RNA s Trizolom

RNA za analizo izražanja genov z RT-PCR smo izolirali z reagentom TRIzol® (Invitrogen) po protokolu, ki ga priporoča proizvajalec.

Teorija: Reagent je monofazna raztopina fenola in gvanidin izotiocianata, ki na vzorec deluje na več načinov: med homogenizacijo in lizo vzorca TRIzol vzdržuje integriteto RNA, celice in njene komponente pa razgraje. Ko po dodatku kloroformu vzorce centrifugiramo, se raztopina loči v zgornjo vodno fazo in spodnjo organsko fazo. RNA se nahaja v vodni fazi, ki jo prenesemo in precipitiramo z dodatkom izopropanola.

Postopek:

- a) Pred pričetkom izolacije RNA vse delovne površine očistimo s sprejem za odstranitev ribonukleaz iz steklenih in plastičnih površin. Za izolacijo RNA uporabljamo le pipetne nastavke, ki so očiščeni vseh zaznavnih RN-az. Ker je so naša koža in lasje bogat vir RN-az, pogosto menjamo zaščitne rokavice.
- b) Odtajamo vzorce, ki so do analize shranjeni v TRIzolu pri -20 °C.
- c) Dobro premešamo odtajene vzorce.
- d) Homogenizirane vzorce inkubiramo 5 minut pri 15-30 °C in s tem dovolimo popolno razgradnjo nukleoproteinskih kompleksov.
- e) Dodamo 0,1 ml kloroform na 500 µl TRIzol reagenta.
- f) Dobro zapremo mikrocentrifugirke in premešamo 15 sekund.
- g) Inkubiramo vzorce na 15-30 °C 2-3 minute.
- h) Centrifugiramo na 12000 x g 15 min pri 2-8 °C.
- i) Prenesemo vodno fazo (zgornja) v svežo mikrocentrifugirko.
- j) RNA precipitiramo z mešanjem z izopropanolom. Dodamo 0,25 ml izopropanola na 0,5ml TRIzola.
- k) Inkubiramo vzorce pri 15-30 °C 10 min in jih nato centrifugiramo pri 12.000 x g 10 min pri 2-8 °C. RNA je po centrifugiranju vidna kot pelet na dnu mikrocentrifugirke.
- l) Odstranimo supernatant in speremo RNA pelet s 75 % etanolom. Dodamo 0,5 ml etanola na 0,5 ml Trizola.
- m) Premešamo vzorce z vibracijskim mešalom ter nato centrifugiramo pri 7500 x g 5 min pri 2-8 °C.
- n) S pipeto previdno odstranimo etanol in osušimo pelete RNA v brezprašni komori. Potrebna je previdnost, da se pelet ne izsuši popolnoma, saj to močno zmanjša njegovo topnost.
- o) Pelet raztopimo v 30 µl vode, ki ne vsebuje RN-az, in shranimo pri -80 °C.

3.2.12 Merjenje koncentracije RNA

Nadaljnji postopki reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo so dragi in dolgotrajni, zato se želimo prepričati, da imamo dovolj RNA za uspešno reverzno transkripcijo, hkrati pa si tudi želimo uravnovežiti količino RNA iz različnih vzorcev pred reverzno transkripcijo.

Postopek smo izvajali kompletom Quant-iTTM RNA assay kit. Uporabili smo fluorometer QuibitTM in QubitTM ultra-tanke optične epruvetke za RT-PCR.

Postopek:

- a) Pripravimo 0,5 ml epruvetke za željeno število vzorcev ter jih označimo.
- b) Pripravimo Quant-iTTM delovno raztopino tako, da razredčimo Quant-iTTM RNA reagent v razmerju 1:200 s Quant-iTTM RNA pufom. Uporabimo plastično posodo. Končni volumen za vsak vzorec bo 200 µl. Pripravimo (število vzorcev + standard)*200 µl delovne raztopine.
- c) Odpipetiramo 190 µl Quant-iTTM delovne raztopine v vsako od obeh epruvetk s standardom.
- d) Dodamo 10 µl vsakega standarda v svojo epruveto in premešamo 2-3 s. Pazimo, da ne ustvarimo mehurčkov.
- e) Odpipetiramo 199 µl Quant-iTTM delovne raztopine.
- f) Odpipetiramo 2 µl vzorca k vsaki epruvetki z delovno raztopino. Skupni volumen mora biti 200 µl. Mešamo 2-3 s.
- g) Inkubiramo v temi pri sobni temperaturi 2 minuti.
- h) Vklopimo QubitTM fluorometer ter ga umerimo s standardom 1 in standardom 2, ki jih zaporedno vstavimo in pomerimo. Nadalujemo z meritvami vzorčnih koncentracij RNA.

3.2.13 Razgradnja DNA

Zaradi motenja signala želimo odstraniti genomsko DNA v naših vzorcih RNA pred začetkom reverzne transkripcije in qPCR. Dnaze I razgradi dvoverižno genomsko DNA na oligonukleotide. Kontaminacija z genomsko DNA lahko vpliva na natančnost kvantifikacije pri qPCR.

Za razgradnjo DNA smo uporabili komplet Dnaze I za razgradnjo genomske DNA v vzorcih proizvajalca Invitrogen.

Postopek: V 0,5 ml mikrocentrifugirke brez prisotnih Rnaz dodamo naslednje:

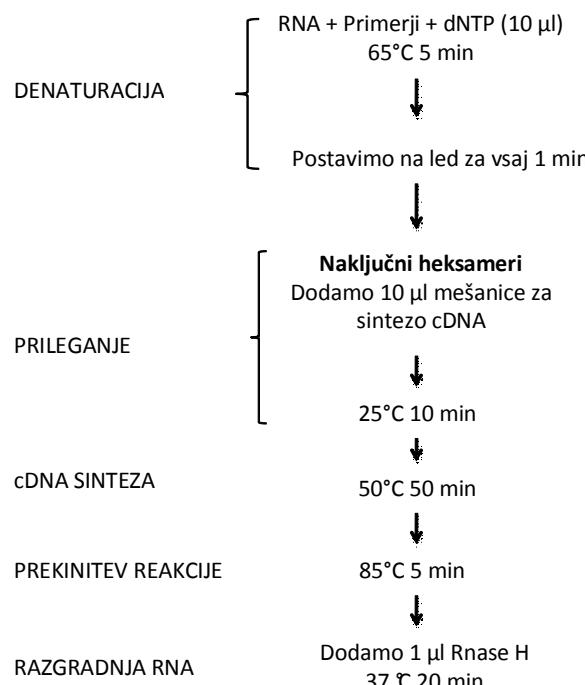
- 1 µg vzorca RNA,
- 1 µl 10X reakcijskega pufra,
- 1 µl Dnaze, 1U/ µl,
- DEPC-tretitrana voda do 10 µl.

Inkubiramo 15 min pri sobni temperaturi. Dnazo inaktiviramo z dodatkom 1 µl 25 mM EDTA reakcijske zmesi. Inkubiramo 10 min pri 65 °C.

Pomembno je, da ne prekoračimo 15-minutne inkubacije z encimom, saj lahko povisena temperatura in predolga inkubacija privedejo do od Mg²⁺ odvisne hidrolize RNA.

3.2.14 Reverzna transkripcija

Ker je molekula RNA zelo nestabilna, enoverižna ter tvori sekundarne strukture, smo jo prepisali v komplementarno DNA (cDNA), ki je stabilnejša. Prepis iz mRNA v cDNA poteka z virusnim encimom reverzna transkriptaza (RT). Za oligonukleotidne začetnike pri reverzni transkripciji smo uporabili naključne heksamere. Za njih smo se odločili, ker so najmanj specifični, celotna populacija RNA pa predstavlja populacijo za sintezo prve verige cDNA, v nadaljnjem qPCR pa uporabimo specifične oligonukleotidne začetnike za gen, ki ga želimo zaznati. Uporabili smo komplet RT-PCR (Invitrogen).



Slika 12: Povzetek postopka reverzne transkripcije

Postopek:

- V 0,2 ml tubico dodamo naslednje komponente:

Preglednica 12: Priprava mešanice za denaturacijo RNA

Komponenta	Količina
Do 5µg skupne RNA	2-5 µl
Oligonukleotidni začetniki: 50 ng/µl naključnih heksamerov	1 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
Voda, tretirana z dietipirokarbonatom	Do 10 µl

- Inkubiramo pri 65 °C 5 min in nato postavimo na led za vsaj 1 min.

Pripravimo mešanico za sintezo cDNA in dodamo vse komponente po naslednjem vrstnem redu:

Preglednica13: Priprava mešanice za sintezo cDNA

Komponenta	Količina za eno reakcijo
10 X RT buffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
inhibitor RnaseOUT™ (40 U/ µl)	1 µl
encim SuperScript™ III RT (200 U/ µl)	1 µl

Pripravimo (število vzorcev + 2)*10 µl mešanice za cDNA sintezo.

- c) Dodamo 10 µl mešanice za cDNA sintezo vsakemu vzorcu RNA – oligonukleotidni začetnik in previdno premešamo. Narahlo precentrifugiramo in inkubiramo po naslednjem vrstem redu: 10 min pri 25 °C nato 50 min pri 50 °C.
- d) Reakcijo ustavimo z inkubacijo pri 85 °C 5 min. Ohladimo na ledu.
- e) Zberemo vsebino epruvetke s kratkim centrifugiranjem. Dodamo 1 µl Rnase k vsaki tubici in inkubiramo 20 min pri 37 °C.

Proizvajalec priporoča uporabo 10 % produkta reakcije sinteze cDNA (2 µl) za nadaljnji qPCR.

3.2.15 PCR v realnem času

Teorija: Kvantitativni PCR (qPCR) je laboratorijska tehnika, ki temelji na PCR in se uporablja za detekcijo, podvojevanje in kvantifikacijo tarčne DNA. Sekvenčno specifična oligonukleotidna DNA sonda s fluorescenčnim označevalcem omogoča detekcijo samo, kadar poteče hibridizacija sonde s komplementarno DNA tarčo. Instrument zazna naraščanje fluorescence pri vsakem ciklu potekajoče reakcije. Cikel, pri katerem fluorescence preseže v naprej določeno mejno vrednost fluorescence, se imenuje prazni cikel (angl. Cycle Threshold, Ct) in odraža količino tarčne cDNA v vzorcu. Pri relativni kvantifikaciji merimo izražanje proučevanega gena in ga normalizirano na izražanje endogene kontrole, s katero standardiziramo količino vzorčne RNA v reakciji (User Bulletin..., 2001). Najbolj pogosto uporabljene endogene kontrole so: β-aktin, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) ter ribosomalna RNA (rRNA).

Postopek:

- a) Priprava vzorcev: Zamrznjene vzorce cDNA smo odmrznili, na kratko pocentrifugirali, razredčili z 20 µl vode ter premešali.
- b) V vsako luknjo 96-luknenjske plošče smo posebej odpipetirali reagente za tarčne gene CBFA-1, PPARy in hišni gen GAPDH:
 - 1,25 µl kompleta za posamezni gen (20 x koncentriran, vsebuje oligonukleotidne začetnike in sondi za zaznavanje),
 - 12,5 µl mešanice Taqman® Universal PCR Master Mix (2x koncentriran),
 - 9,25 µl voda brez DN-az in RN-az,
 - 2 µl vzorca cDNA.
- c) Za negativno kontrolo smo v eno luknjo namesto vzorca odpipetirali vodo. S tem smo preverili, da voda ni kontaminirana z nukleinskimi kislinami in je reakcija res posledica reakcije s tarčno DNA v vzorcu.

- d) Ploščo smo zapečatili z adhezivno folijo, ki preprečuje izhlapevanje reakcije, ter jo na kratko centrifugirali.
- e) Reakcija qPCR: vzorčno cDNA smo pomnoževali v aparaturi za RT-PCR po naslednjem programu:
- začetna denaturacija vzorca (1 cikel)
 - 50 °C, 2 min
 - 95 °C, 10 min
 - Pomnoževanje (50 ciklov)
 - 95 °C, 15 s – denaturacija
 - 60 °C, 1 min – prileganje začetnih oligonukleotidov, pomnoževanje
- f) Analiza rezultatov: Rezultate smo analizirali s programom SDS 2.1 (Applied Biosystems). Za nastavitev osnovnih vrednosti (»baseline«) smo upoštevali napotke proizvajalca, za nastavitev mejne vrednosti fluorescence (»threshold«) pa smo nastavili 0,2 (območje linearnega poteka reakcije). Izražanje tarčnih genov smo normalizirali glede na izražanje hišnega gena GAPDH za vsak vzorec po primerjalni metodi ΔC_T in med seboj primerjali relativne vrednosti različnih vzorcev.

3.2.16 Histološke analize

3.2.16.1 Fiksacija, vpenjanje peletov v histogel ter priprava histoloških rezin

Pelete smo 24 ur fiksirali v 3,7 % formaldehidu pri sobni temperaturi, nato pa smo jih prenesli v 70 % etanol in shranili pri 4 °C. Pelete smo nato zalili s histogelom ter jih poslali na Oddelek za histologijo, kjer so vzorce vklopili v parafin, iz njih pripravili 5 µm debele histološke rezine na objektnih steklih.

3.2.16.2 Barvanje Von Kossa histoloških rezin

Uporabljamo 5 % raztopino srebrovega nitrata (Sigma) v destilirani vodi ter raztopino barvila Nucelar Fast Red (Sigma).

Postopek:

- a) Objekta stekla s histološkimi rezinami peletov inkubiramo 30 min pri 55 °C. S tem zmehčamo parafin, v katerega so vpete rezine peletov.
- b) Odstranitev parafina: inkubiramo v Citrisolu; 2-krat po 2 minut.
- c) Postopna rehidracija: inkubiramo v 100 % etanol 2-krat 2 min → 95 % etanol 2 min → 70 % etanol 2 min → 50% etanol 2 min → 3-krat speremo z destilirano vodo.
- d) Na objektno steklo z vzorcem nanesemo 5 % raztopino srebrovega nitrata (AgNO_3) in izpostavimo močni beli svetlobi (žarnica) za 1 uro.
- e) 3-krat speremo z destilirano vodo.
- f) 5 min spiramo z vodo iz pipe in nato speremo z destilirano vodo.
- g) Histološke rezine dodatno obarvamo z barvilom Nuclear Fast Red (rdeče obarva jedra) 5 min. Spiramo v destilirani vodi.
- h) Dehidracija histoloških rezin (korak c v obratnem zaporedju).
- i) Histološke rezine vpnemo v medij Permount in pokrijemo s krovnim stekлом.

3.2.16.3 Barvanje histoloških rezin z alcianskim modrilom

Teorija: Alciansko modrilo (Alcian blue 8GX, Ingrain blue) je ftalocianinsko barvilo, ki vsebuje baker. Je kationsko barvilo, ki obarva mukopolisahardie in glikozaminoglikane v

modro do modrozelene barvo. Način vezave na negativno nabite makromolekule je elektrostatski.

Priprava delovnih raztopin:

1 % raztopina alcianskega modrila (pH 1.0) - Raztopimo 1,0 g barvila v 100 ml 0,1 M klorovodikove kisline (HCl) in mešamo vsaj 6 ur ter nato prefiltriramo barvilo skozi papirni filter.

3 % ocetna kislina - 15 ml glacialne ocetne kisline dodamo 485 ml distilirane vode.

Kisli alkohol za alciansko modrilo - 495,00 ml 70 % etanola dodamo 5,0 ml koncentrirane (12N) HCl.

Postopek:

- a) Objekta stekla s histološkimi rezinami peletov inkubiramo 30 min pri 55 °C. S tem zmehčamo parafin, v katerega so vpete rezine peletov.
- b) Odstranitev parafina: inkubiramo v citrisolu; 2-krat po 2 minut.
- c) Postopna rehidracija: inkubiramo v 100 % etanol 2-krat 2 min → 95 % etanol 2 min → 70 % etanol 2 min → 50 % etanol 2 min → 3-krat speremo z destilirano vodo.
- d) Inkubacija v 3 % ocetni kislini (3 min).
- e) Barvanje v raztopini alcianskega modrila (15 min).
- f) Odstranitev odvečnega modrila z inkubacijo v kislem alkoholu (3 min).
- g) Odstranitev odvečnega modrila z inkubacijo v svežem kislem alkoholu (3 min).
- h) Dehidracija pobarvanih rezin: 95 % etanol (1 min) → 100 % etanol (1 min) → citrisol (1 min).
- i) Histološke rezine prekrijemo z medijem Permount in pokrijemo s krovnim stekлом.

3.2.17 Nasajevanje hESC-P na nosilce iz decelularizirane kosti

Želeli smo preveriti, ali bi hESC-P lahko uporabili za pripravo tridimenzionalnih tkivnih konstruktov. Ugotavljali smo, kakšna je uspešnost nasajevanja in prezivetje hESC-P 1 in 3 dni po nasaditvi na biološki nosilec. Za nosilec smo izbrali decelularizirano govejo kost, ki je bila uporablена v prejšnjih študijah (Grayson in sod., 2008). Dejavniki, ki so prispevali k izbiri tega materiala, so: dobra biokompatibilnost, naraven material z optimalno poroznostjo in ugodne mehanske lastnosti nosilca.

3.2.17.1 Priprava celičnih nosilcev iz decelularizirane goveje kosti

Za pripravo nosilcev smo uporabili gobasto (trabekularno) kostno tkivo iz subhondralne regije kolenskega sklepa 2 tedna do 4 mesece starega goveda.

Postopek:

- a) Z vrtalnim strojem izvrтamo luknje v sklep. Koščke kosti položimo v 15 ml centrifugirko in spiramo pod vodo, dokler popolnoma ne odstranimo kostnega mozga (koščki morajo biti po spiranju popolnoma bele barve).
- b) Inkubiramo v PBS + 0,1 % EDTA najmanj 1 uro.
- c) Inkubiramo v 10 mM pufru TRIS + 0,1 % EDTA 12 ur pri 11 °C pri stalnem mešanju na mešalniku.
- d) Inkubiramo v 0,5 % SDS + 10 mM TRIS 18-24 ur pri sobni temperaturi na mešalniku.
- e) Spiramo v PBS, dokler ne izginejo vsi mehurčki (20-30-krat po 15 min ob stalnem mešanju).

- f) Inkubiramo z 100 U/ml Dnaze in Rnaze 6 ur pri 37 °C in občasnem mešanju.
- g) Spiramo s PBS 2-krat 5 min.
- h) Spiramo v 70 % etanolu 5 min.
- i) Liofiliziramo do popolne suhosti
- j) Decellularizirane nosilce s skalpelom narežemo na 4,5-5,5 mm koščke (optimalno potrebujemo 4 x 4 mm koščke valjaste oblike).
- k) Nosilce s pomočjo vpenjalnega ravnila ter polirnega stroja zgladimo na velikost 3,8-4,3 mm.
- l) Nosilce stehtamo in izračunamo gostoto. Za poskus izberemo nosilce, ki imajo pravilno obliko, velikost ter gostoto med 0,39 in 0,45 mg/mm³.
- m) Izbrane nosilce čez noč dezinficiramo v 70 % etanolu.
- n) Nosilce kondicioniramo v osteogenem mediju čez noč.

3.2.17.2 Nasajevanje hESC-P na nosilce

- a) Celice hESC-P smo tripsinizirali ter pripravili suspenzijo celic v osteogenem gojišču s koncentracijo $1,5 \cdot 10^6$ celic/40 µl. Zaradi zelo velike gostote celične suspenzije smo pri izračunih upoštevali tudi volumen samih celic.
- b) Nosilec prenesemo iz medija na sterilno papirnato brisačo, in tako popivnamo medij, ki se nahaja v porah nosilca.
- c) Počasi odpipetiramo 40 µl celične suspenzije na nosilec. Pri tem pazimo, da se suspenzija razporedi enakomerno po nosilcu ter da ne odteče mimo nosilca.
- d) Konstrukte s celicami previdno položimo v inkubator. Konstrukte zaradi bolj enakomerne razporeditve celic po nosilcu vsake 15 min obračamo vertikalno (4 obrati). Po drugem obratu konstruktom dodamo 10 µl svežega osteogenega medija; po četrtem obratu v luknje gojilne posode s konstrukti dodamo 6 ml osteogenega gojišča ter gojimo v inkubatorju 1 ali 3 dni.
- e) Razporeditev celic na nosilcu: Na prvi in tretji dan po nasajevanju celic na nosilec na polovico prerezane konstrukte fiksiramo v 3,7 % formaldehidu 24 ur ter jih nato prenesemo v 70 % etanol. Tako pripravljeni vzorce pošljemo na histologijo, kjer iz njih pripravijo 5 µm debele histološke rezine ter jih obarvajo s hematoksilinom-eozinom za boljšo vidljivost celic.
- f) Uspešnost nasajevanja: prvi in tretji dan po nasajevanju celic na nosilec izmerimo količino DNA v nosilcih (pomeni število celic). Vsebnost DNA v nosilcih primerjamo s kontrolnimi vrednostmi: ob nasajevanju prenesemo kontrolne nosilce v epruvetke za vzorčenje in jim dodamo enako število celic kot nasajenim nosilcem. Vpliv nosilca na izmerjeno koncentracijo DNA ugotavljamo s kontrolami, kjer merimo vsebnost DNA v vzorcu $1,5 \cdot 10^6$ celic/40 µl. Vzorce hranimo pri -20 °C do analize DNA.
- g) Preživetje celic: prvi in tretji dan po nasajevanju celic ugotavljamo živost celic, kot je opisano v točki 3.2.17.3.

3.2.17.3 Merjenje viabilnosti celic

Viabilnost (živost) celic smo merili s kompletom Live/Dead™ proizvajalca Invitrogen.

Teorija: V živih celicah delujejo znotrajcelične esteraze, ki pretvorijo nefluorescentno polianionsko barvilo kalcein AM (komponenta A) v intenzivno fluorescentno obliko (eksitacija~495 nm, emisija~515 nm), zato žive celice svetijo zeleno. Etidijev homodimer-1 (komponenta B) lahko vstopi le v celice s poškodovano membrano, pri čemer se mu pri vezavi na nukleinske kisline fluorescenco poveča za 40-krat in obarva mrtve celice rdeče (eksitacija~495 nm, emisija~634 nm). Skozi membrano intaktnih živih celic etidijev

homodimer-1 ne more prehajati. Rezultat testa so zeleno obarvane žive ter rdeče obarvane mrtve celice.

Postopek:

- a) Pripravili smo raztopino RPMI gojišča (brez fenola, saj ta moti fluorescenco) pri 37 °C s končno koncentracijo komponente A 0,5 µl/ml ter komponente B 2 µl/ml.
- b) Konstrukte s celicami smo s skalpelom prerezali na polovice, prekrili z raztopino barvila ter inkubirali 20 min v inkubatorju pri 37 °C.
- c) Celice smo pregledali pod fazno kontrastnim in fluorescenčnim mikroskopom. Žive celice smo zaznali s svetlobnim filtrom FITC (fluorescein izotiocianat, eksitacija 494 nm emisija 518 nm), mrtve pa s TRITC (tetrametil rodamin izotiocianat, eksitacija 557 nm emisija 576 nm). Pridobljeni sliki smo računalniško združili ter nastavili zeleno barvo za žive celice (filter FITC) ter rdečo za mrtve (filter TRITC).

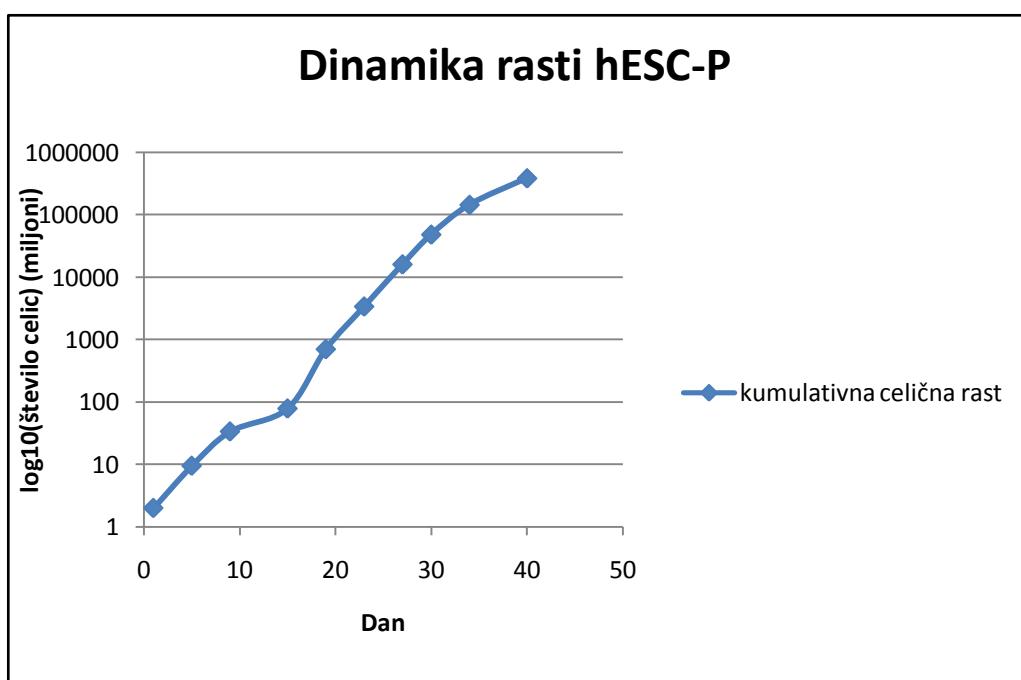
3.2.18 Statistične analize

Rezultati so predstavljeni kot povprečje \pm standardni odklon. Statistično signifikantnost rezultatov smo ugotavljali z enostranskim ANOVA testom, ki mu je sledil Tukey Posthoc test. Za statistične analize smo uporabili program Statistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). Statistično značilne so razlike med skupinami, kjer je $p < 0,05$ (95 % interval zaupanja).

4 REZULTATI

4.1 DINAMIKA RASTI IN MORFOLOGIJA HESC-P

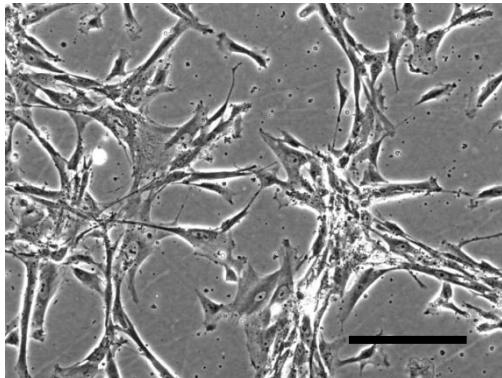
Dinamiki rasti predniških celic, pridobljenih iz humanih embrionalnih matičnih celic (hESC-P), smo sledili od druge do dvanajste pasaže (**Slika 13**). Število celic je med gojenjem enakomerno naraščalo: v konfluentni tretji pasaži bi pridobili 2 miljona celic, v peti pasaži 33,7 miljonov in v dvanajsti pasaži 386 miljard celic. Celice so dosegle konfluenco (preraščenost gojilne posode) povprečno v 4-5 dneh po nasaditvi, povprečen podvojevalni čas pa je bil 2 dni.



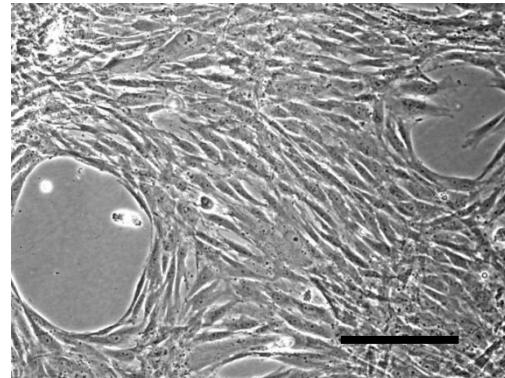
Slika 13: Dinamika rasti hESC-P skozi podaljšano gojenje (40 dni). Kumulativna celična rast je izračunana kot število celic, ki bi jih dobili, če bi pri vsaki pasaži presadili vse celice.

Morfološko se hESC-P med pasažami niso spremajale (**Slike 14-27**) in so bile po obliki podobne celicam BMSC obeh donorjev ter NHF (**Slika 28** in **Slika 29**). Po nasaditvi na gojilne posode so se celice že po nekaj urah pritrdile na plastiko, ki je bila prevlečena z želatino, ter pridobile fibroblastom podobno vretenasto obliko. V kulturi so rastle v mreži (**Slika 14**), ob večji preraščenosti so postale so zelo tanke in vretenaste ter se začele tudi prepletati in rasti ena preko druge, vmes pa so ponekod ostale manjše luknje brez celic (**Slika 15**).

Pasaža 4:

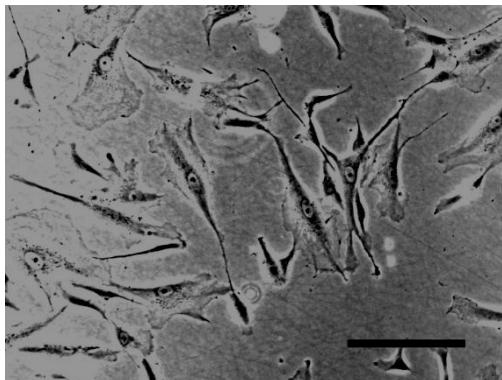


Slika 14: hESC-P, 4. pasaža, 30 % konfluentnost, 100-kratna povečava, merilo je 200 μm

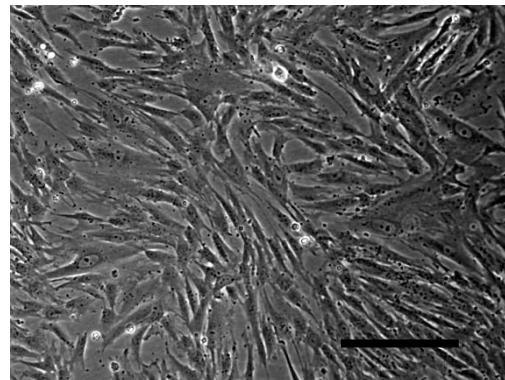


Slika 15: hESC-P, 4. pasaža, 90 % konfluentnost, 100-kratna povečava, merilo je 200 μm .

Pasaža 5:

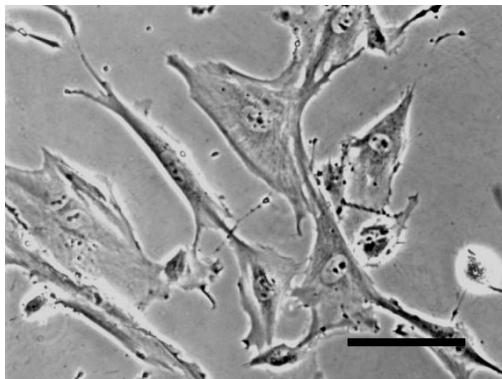


Slika 16: hESC-P, 5. pasaža, 20 % konfluentnost, 100-kratna povečava, merilo je 200 μm

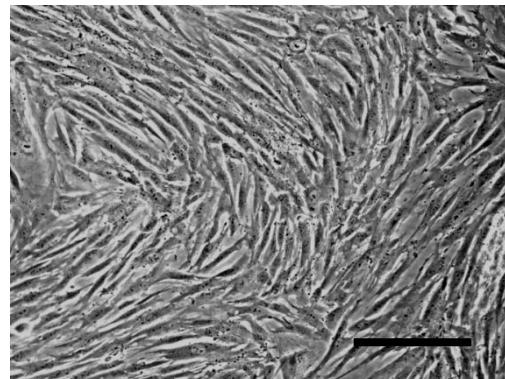


Slika 17: hESC-P, 5. pasaža, 90 % konfluentnost, 100-kratna povečava, merilo je 200 μm

Pasaža 6:

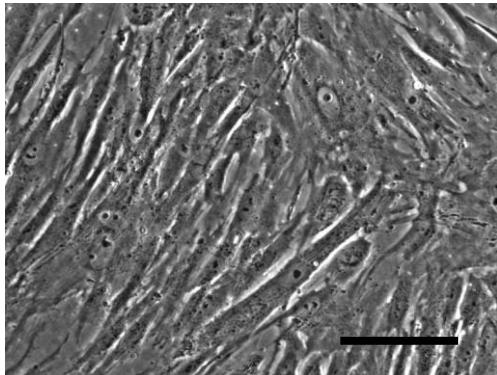


Slika 18: hESC-P, 6. pasaža, 40 % konfluentnost, 200-kratna povečava, merilo je 100 μm

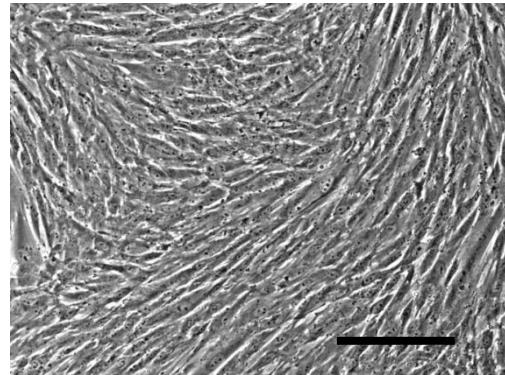


Slika 19: hESC-P, 6. pasaža 100 % konfluentnost, 200-kratna povečava, merilo je 100 μm

Pasaža 7 in 8:

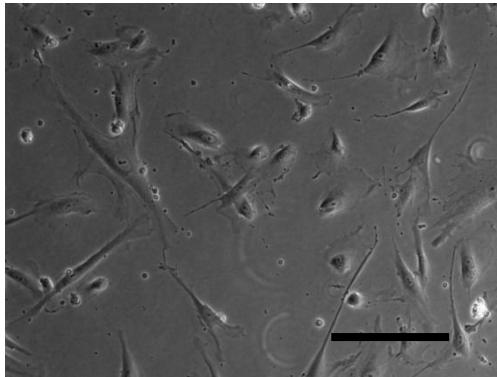


Slika 20: hESC-P, 7. pasaža, 90 % konfluentnost, 200-kratna povečava, merilo je 100 μm

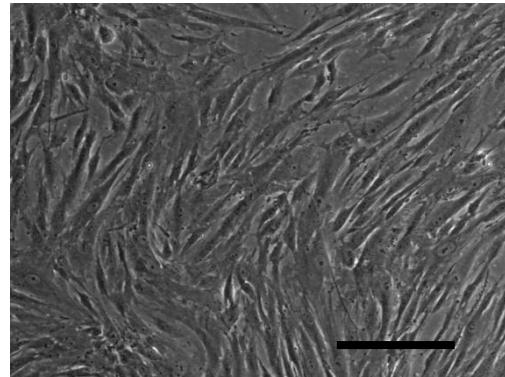


Slika 21: hESC-P, 8. pasaža, 100 % konfluentnost, 100-kratna povečava, merilo je 200 μm

Pasaža 9:

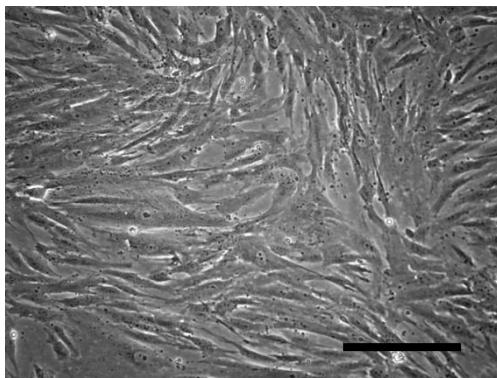


Slika 22: hESC-P, 9. pasaža, 30 % konfluentnost, 100-kratna povečava, merilo je 200 μm

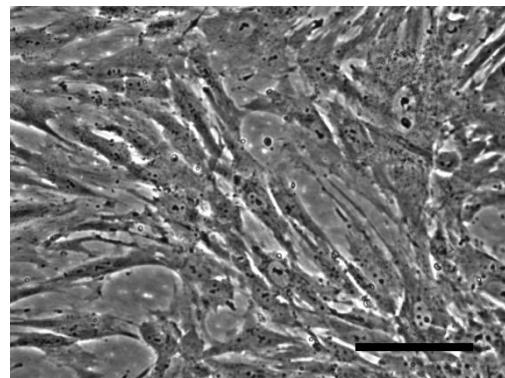


Slika 23: hESC-P, 9. pasaža, 90 % konfluentnost, 100-kratna povečava, merilo je 200 μm

Pasaža 10:

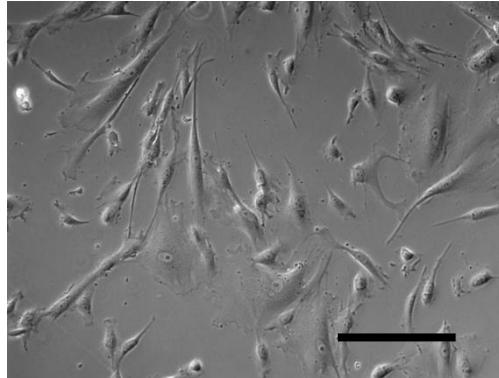


Slika 24: hESC-P, 10. pasaža, 80 % konfluentnost, 100-kratna povečava, merilo je 200 μm

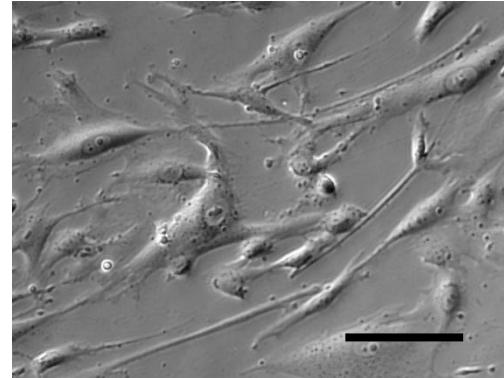


Slika 25: hESC-P, 10. pasaža, 80 % konfluentnost, 200-kratna povečava, merilo je 100 μm

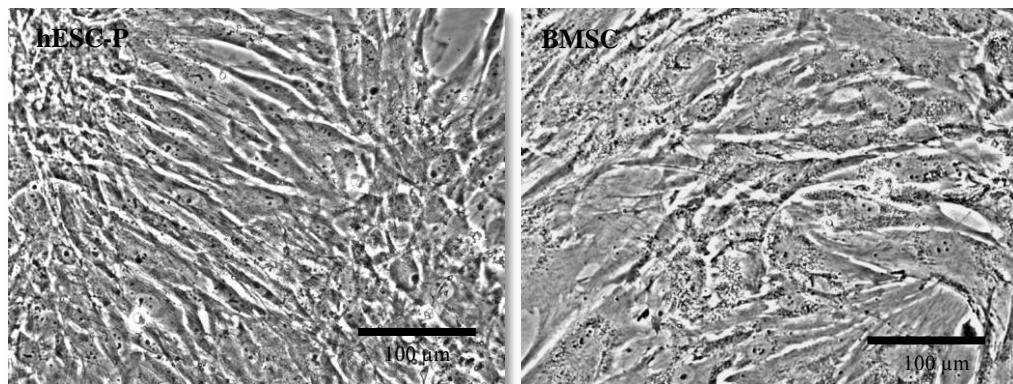
Pasaža 11:



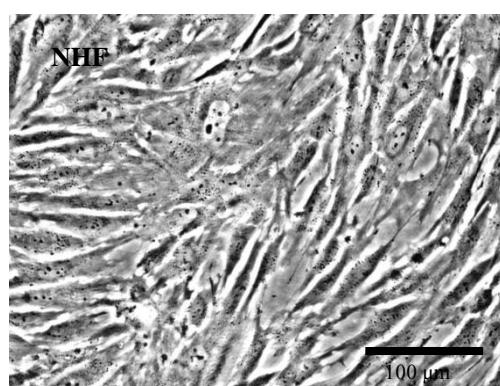
Slika 26: hESC-P, 11. pasaža, 30 % konfluentnost, 100-kratna povečava, merilo je 200 µm



Slika 27: hESC-P, 11. pasaža, 30 % konfluentnost, 200-kratna povečava, merilo je 100 µm



Slika 28: Primerjava morfologije hESC-P in BMSC. Obe sliki sta posneti na 200-kratni povečavi pri 4. pasaži in 90 % konfluentnosti. hESC-P so morfološko primerljive z BMSC.



Slika 29: NHF v kulturi, 4. pasaža, 90 % konfluentnost, slika je posneta pri 200-kratni povečavi

Slika 28 in **Slika 29** prikazujeta morfologijo hESC-P, BMSC in NHF pred pričetkom eksperimenta preverjanja diferenciacijskega potenciala v monoslojih in peletih. BMSC so v povprečju dosegle konfluenco v petih dneh, povprečen podvojitveni čas BMSC pa je bil 4 dni. NHF so dosegle konfluenco v 6 dneh, povprečen podvojitveni čas pa je bil 3 dni.

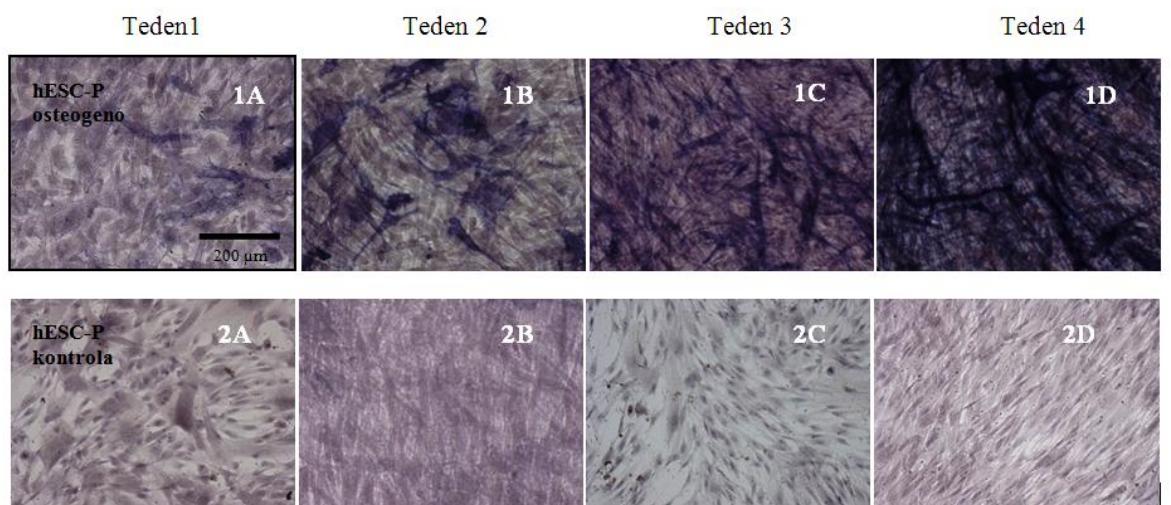
4.2 UGOTAVLJANJE DIFERENCIACIJSKEGA POTENCIALA HESC-P

4.2.1 Diferenciacija celic v monoslojih

4.2.1.1 Preverjanje osteogenega potenciala

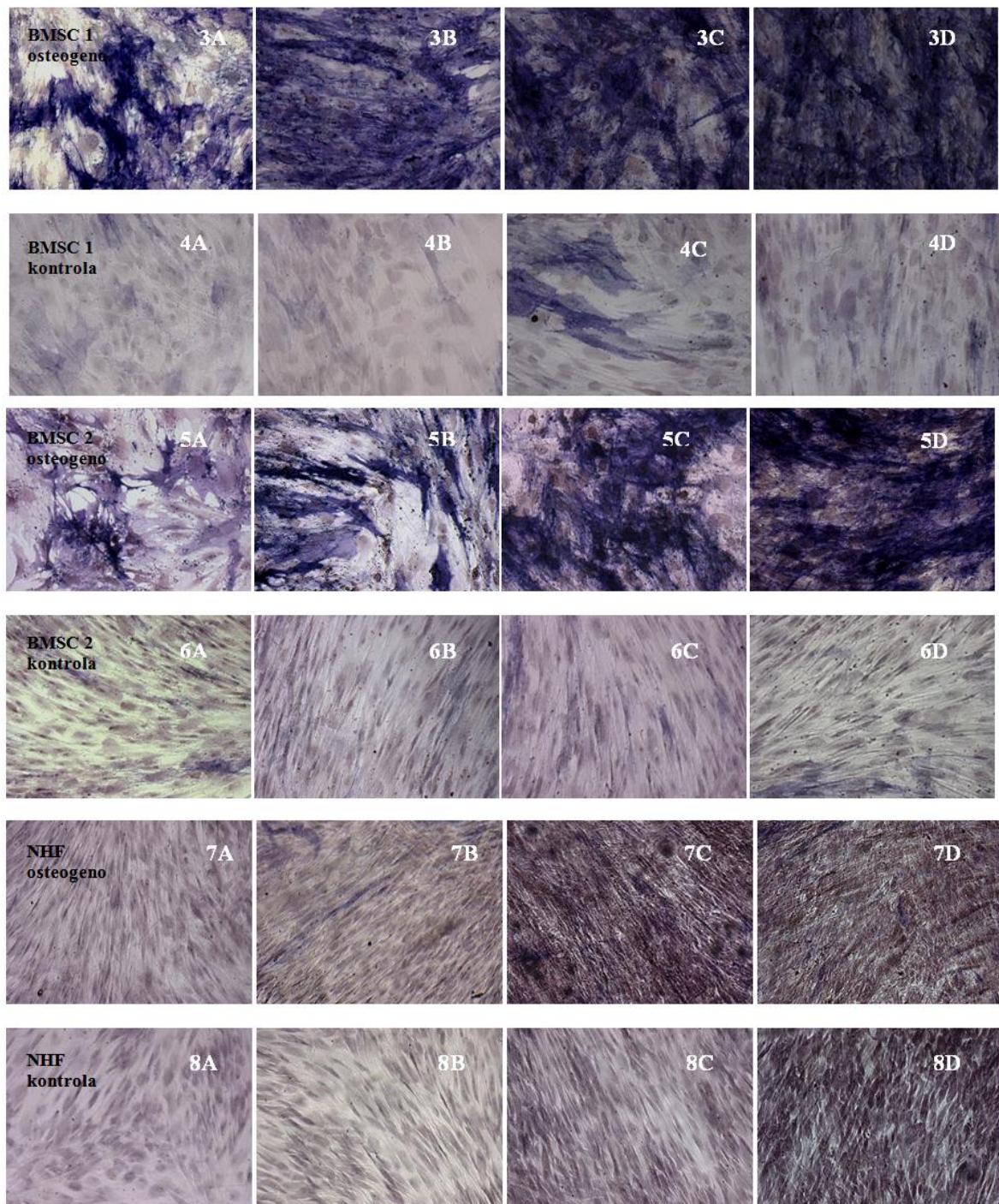
4.2.1.1.1 Aktivnost alkalne fosfataze

Aktivnost alkalne fosfataze, ki je značilna za osteogene celice v zgodnjih stopnjah diferenciacije, se je v osteogenem gojišču pri hESC-P skozi čas gojenja povečevala (**Slika 30, 1A-1D**) v primerjavi s kontrolnim gojiščem, kjer aktivnosti nismo zaznali (**Slika 30, 2A-2D**). Aktivnost alkalne fosfataze je bila pri hESC-P v prvih dveh tednih kultivacije nižja kot pri BMSC prvega donorja in primerljiva z BMSC drugega donorja, v tretjem in četrtem tednu pa je bila aktivnost primerljiva z BMSC. Sklepamo, da imajo hESC-P primerljiv osteogen potencial kot BMSC. Poleg tega je tako pri hESC-P kot tudi pri vzorcih BMSC le del celic v populaciji pozitiven za prisotnost alkalne fosfataze. Pri NHF (negativna kontrola) aktivnosti alkalne fosfataze med 4 tedni gojenja v osteogenem gojišču nismo zaznali, z izjemo posamičnih celic (**Slika 30, 7A-7D**). Pozitivna reakcija so temno vijolično obarvane celice. Vse celice so bile za boljšo vidljivost in kontrast obarvane tudi s hematiksilinskim barvilom.



Se nadaljuje

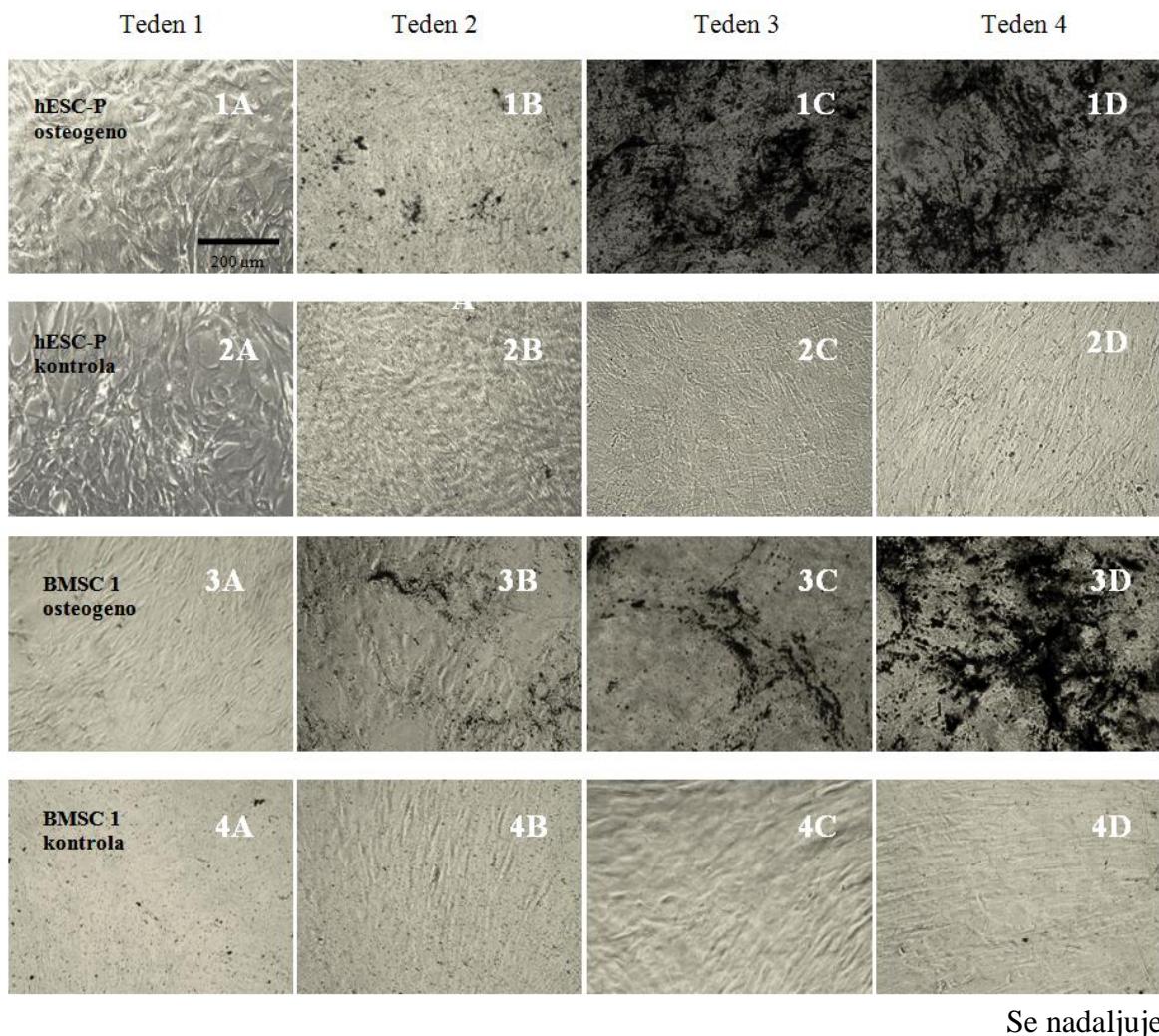
Nadaljevanje



Slika 30: Naraščanje aktivnosti alkalne fosfataze v tednih 1-4 pri različnih celičnih tipih. (1A-1D) hESC-P osteogeno gojišče; (2A-2D) hESC-P kontrolno gojišče; (3A-3D) BMSC 1 osteogeno gojišče; (4A-4D) BMSC 2 kontrolno gojišče; (5A-5D) BMSC 2 osteogeno gojišče; (6A-6D) BMSC 2 kontrolno gojišče, (7A-7D) NHF osteogeno gojišče; (8A-8D) NHF kontrolno gojišče.

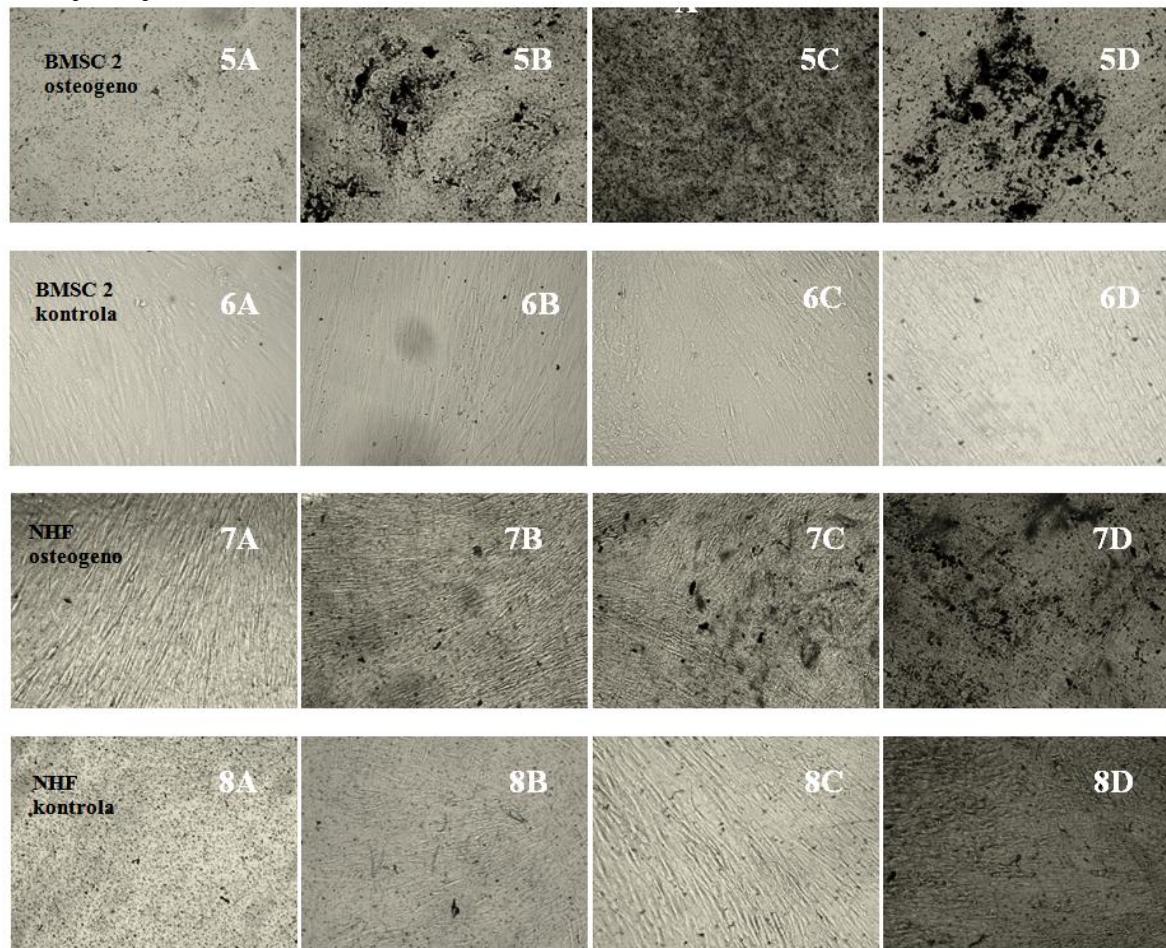
4.2.1.1.2 Barvanje Von Kossa

hESC-P so med 4-tedenskim gojenjem kopile kalcij (**Slika 31**), ki je eden od indikatorjev osteogene diferenciacije. Mesta nalaganja kalcija so obarvana črno. V primerjavi z BMSC so bile hESC-P na začetku (teden 2) manj odzivne na osteogeno indukcijo, v nadaljevanju gojenja pa so kopile kalcij v večji meri kot BMSC obeh donorjev. Vzorec nalaganja kalcija je bil pri hESC-P nekoliko drugačen kot pri BMSC: BMSC so kalcij nalagale bolj v skupkih, hESC-P pa bolj enakomerno po celi površini (**Slika 31**; 1D, 3D in 5D). Razlika je bila tudi v sposobnosti nalaganja kalcija med vzorci BMSC: BMSC 1 so po 4 tednih nakopile več minerala kot BMSC 2 (**Slika 31**, 3D in 5D). Pri posameznih celicah smo pozitivno reakcijo zaznali tudi pri NHF v osteogenem gojišču.



Se nadaljuje

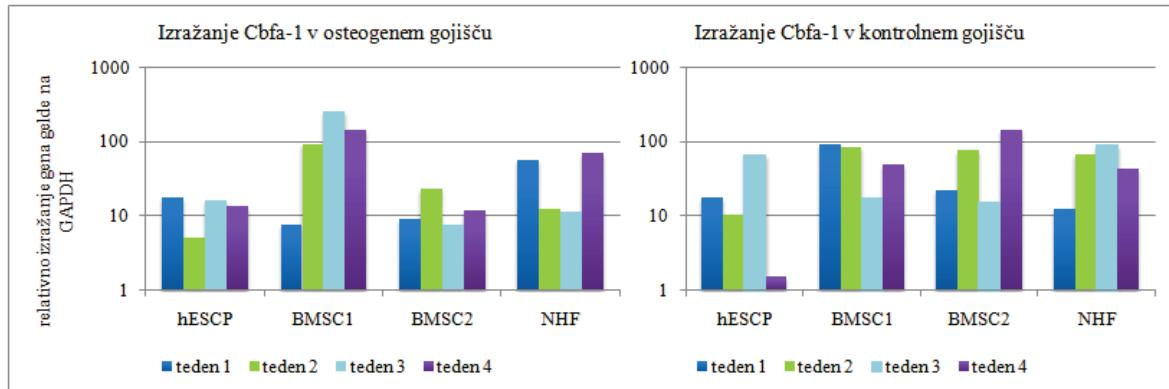
Nadaljevanje



Slika 31: Celično barvanje Von Kossa v tednih 1-4 pri različnih celičnih tipih. Pozitivna reakcija so črno obarvana mesta nalaganja kalcija. (1A-1D) hESC-P osteogeno gojišče; (2A-2D) hESC-P kontrolno gojišče; (3A-3D) BMSC I osteogeno gojišče; (4A-4D) BMSC I kontrolno gojišče; (5A-5D) BMSC II osteogeno gojišče; (6A-6D) BMSC II kontrolno gojišče; (7A-7D) NHF osteogeno gojišče; (8A-8D) NHF kontrolno gojišče.

4.2.1.1.3 Izražanje osteogenega označevalca Cbfa-1 (Runx-2)

Cbfa-1 je transkripcijski faktor, ki je povezan z osteoblastno diferenciacijo. Kljub njegovi ključni vlogi v osteogenezi nismo izmerili pomembnega povišanja izražanja Cbfa-1 v osteogenem gojišču v primerjavi s kontrolnim gojiščem tako pri hESC-P kot tudi pri primerjalnih celičnih tipih (BMSC 1, BMSC 2 in NHF) (**Slika 32**).

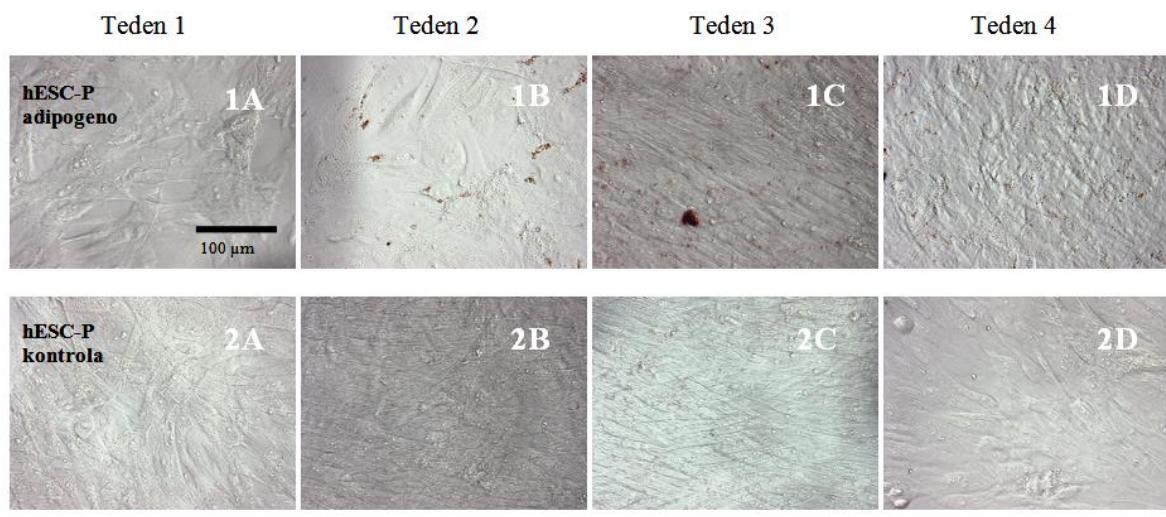


Slika 32: Izražanje osteogenega označevalca Cbfa-1 v osteogenem in kontrolnem gojišču

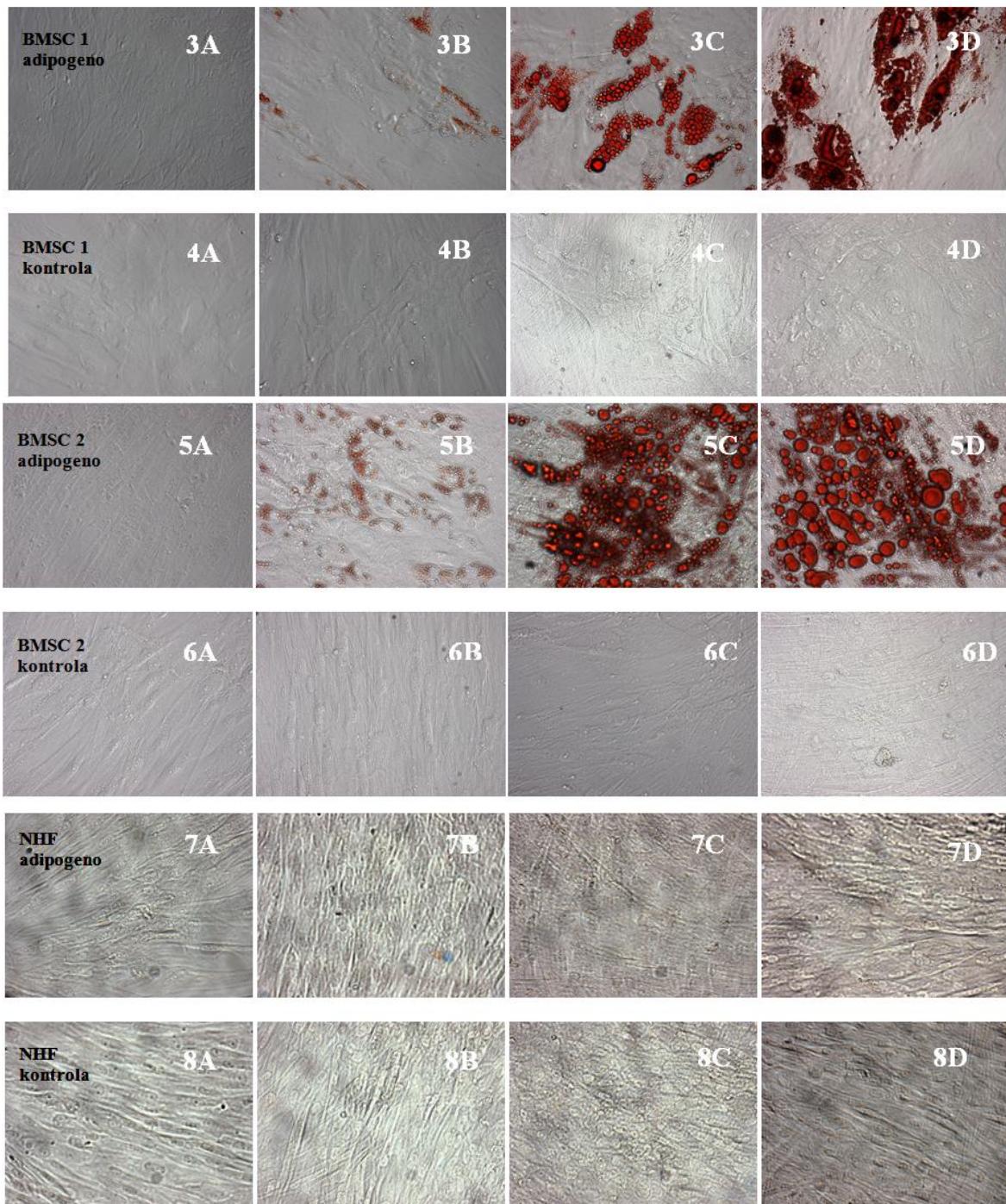
4.2.1.2 Preverjanje adipogenega potenciala

4.2.1.2.1 Barvanje Oil Red O

hESC -P, ki smo jih gojili v adipogenem gojišču, so bile po 2 in 3 tednih gojenja le šibko pozitivne za Oil Red O (**slika 33**, 1B in 1C) v primerjavi z BMSC, ki so po treh tednih kultivacije v adipogenem gojišču tvorile velike maščobne vakuole (**Slika 33**, 3C in 5C). BMSC 2 so v primerjavi z BMSC 1 tvorile večje in bolj številne lipidne vakuole (**Slika 33**, 3D in 5D), pri NHF pa lipidnih vakuol nismo zaznali (**Slika 33**, 7A-7D).



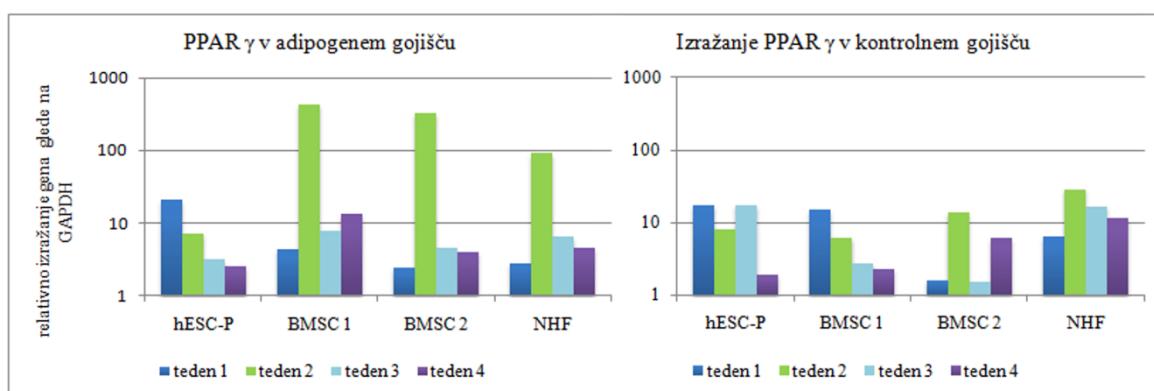
Nadaljevanje



Slika 33: Celično barvanje Oil Red O v tednu 1-4 pri različnih celičnih tipih. Pozitivna reakcija so rdeče obarvane lipidne vakuole. (1A-1D) hESC-P adipogeno gojišče; (2A-2D) hESC -P kontrolno gojišče; (3A-3D) BMSC 1 adipogeno gojišče; (4A-4D) BMSC 1 kontrolno gojišče; (5A-5D) BMSC 2 adipogeno gojišče; (6A-6D) BMSC 2 kontrolno gojišče; (7A-7D) NHF adipogeno gojišče; (8A-8D) NHF kontrolno gojišče.

4.2.1.2.2 Izražanje adipogenega označevalca PPAR γ

Transkripcijski faktor PPAR γ je označevalec adipogeneze. Pri hESC-P povečanega izražanja PPAR γ v adipogenem gojišču v primerjavi s kontrolnim gojiščem nismo zaznali (**Slika 34**), kar nakazuje, da celice niso bile odzivne na adipogeno stimulacijo. V nasprotju s hESC-P pa smo pri BMSC obenj donorjev opazili velik porast v izražanju receptorja PPAR γ po 2 tednih gojenja. Povečano izražanje PPAR γ v drugem tednu rasti sovpada s časom indukcije adipogeneze, s katero smo začeli po enem tednu gojenja, ko so celice dosegle konfluenco. Po 1 tednu indukcije smo celice še dva tedna gojili v gojišču za vzdrževanje adipogenega fenotipa, v tem času se je izražanje PPAR γ zmanjšalo in je bilo primerljivo vrednosti izmerjeni po 1 tednu. Nekoliko povisitev izražanja PPAR γ smo zaznali tudi pri negativni kontroli NHF po 2 tednih gojenja.

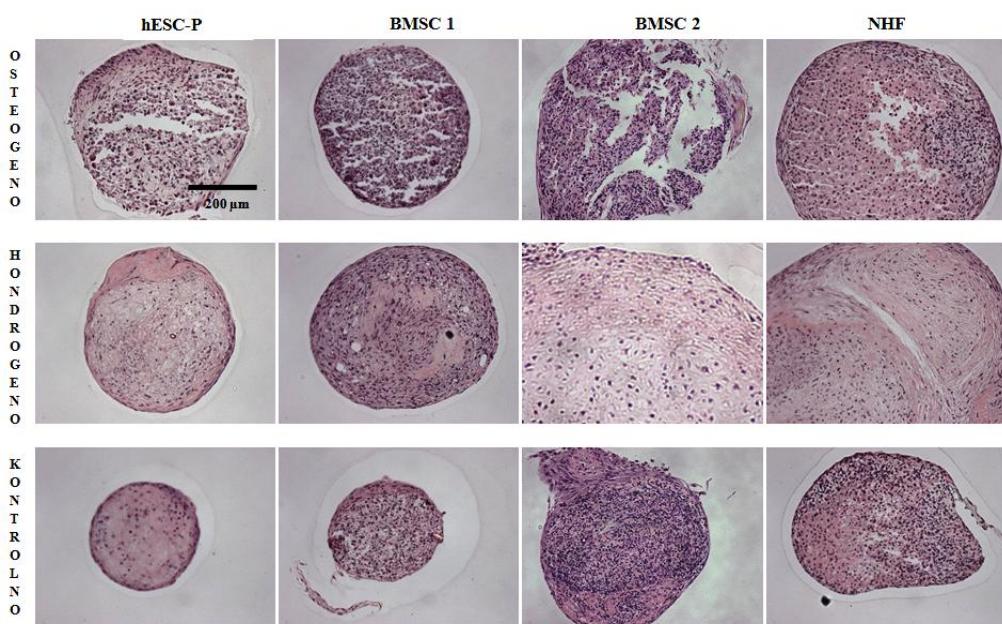


Slika 34: Izražanje adipogenega označevalca PPAR γ v adipogenem in kontrolnem gojišču

4.2.2 Diferenciacija celic v peletih

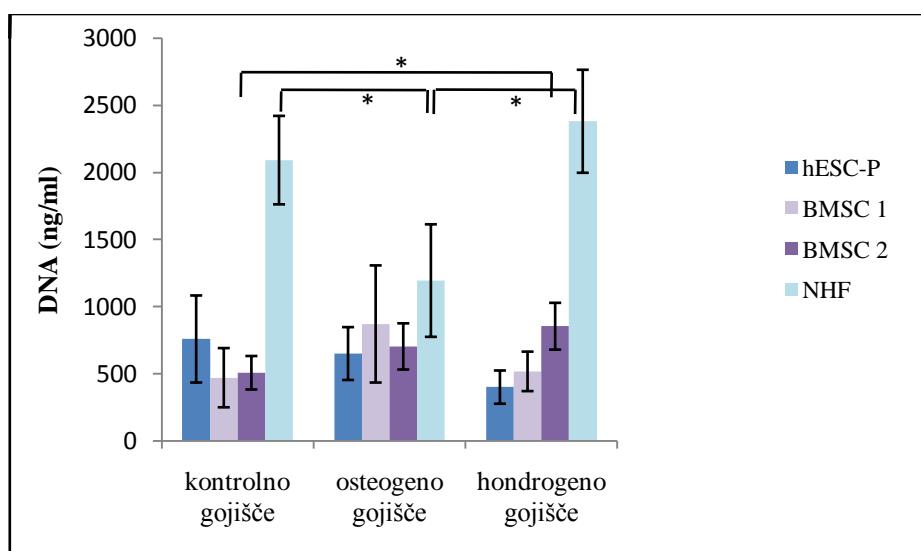
4.2.2.1 Morfologija in vsebnost DNA v peletih

Po štirih tednih gojenja v osteogenem, hondrogenem in kontrolnem gojišču smo primerjali velikost in vsebnost DNA v peletih hESC-P, BMSC 1, BMSC 2 in NHF. Velikost peletov smo primerjali z opazovanjem histoloških rezin pod svetlobnim mikroskopom (**Slika 35**). Največji so bili peleti iz BMSC 2 in NHF. Znotraj posameznih celičnih tipov so bili v vseh primerih peleti najmanjši v kontrolnem gojišču, največji pa v hondrogenem gojišču. Peleti v hondrogenem gojišču so bili še posebno veliki v primeru BMSC 2 in NHF. Sklepamo, da so komponente hondrogenega gojišča vplivale na povečevanje velikosti peleta.



Slika 35: Histološke rezine peletov, obarvane s hematoksilinom za boljšo vidnost celic. Primerjava velikosti in morfologije peletov iz hESC-P, BMSC 1, BMSC 2 ter NHF v hondrogenem, osteogenem ter kontrolnem gojišču

Z merjenjem količine DNA smo ocenjevali število celic v peletih. Ob predpostavki, da so vsi peleti na dan 1 vsebovali enako število celic (300.000 celic/pelet), lahko sklepamo, da se je med 4 tedni kultivacije najbolj povečevalo število celic pri peletih iz NHF (**Slika 36**). Pri BMSC 2 je bila v hondrogenem gojišču količina DNA statistično pomembno večja ($p<0,05$) kot v kontrolnem gojišču. Pri hESC-P in BMSC 1 ni bilo statistično pomembnih razlik v številu celic na pelet v med različnimi gojišči. Pri NHF je bila količina DNA v osteogenem gojišču statistično pomembno nižja v primerjavi s kontrolnim in hondrogenim gojiščem ($p<0,05$).

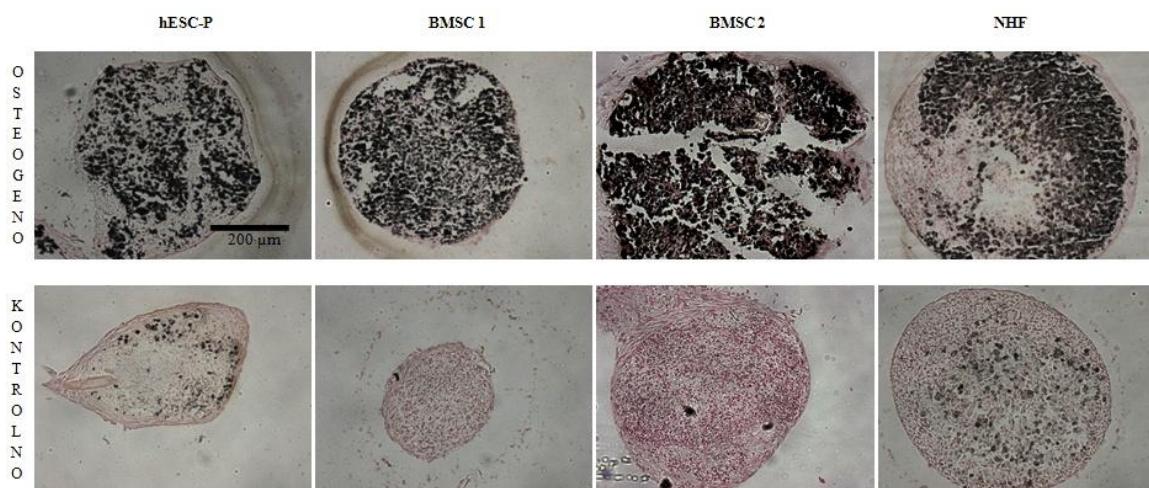


Slika 36: Primerjava števila celic v peletih po 4 tednih kultivacije v osteogenem, kontrolnem in hondrogenem gojišču med različnimi tipi celic. Velikost peleta je izražena kot količina DNA (ng/ml). Število vzorcev v skupini n = 4-6 za hESC-P, n = 4-5 za BMSC 1, n = 5-6 za BMSC 2 in n = 5-6 za NHF. Zvezdica označuje statistično pomembno razliko med skupinama ($p<0,05$).

4.2.2.2 Preverjanje osteogenega potenciala

4.2.2.2.1 Barvanje Von Kossa

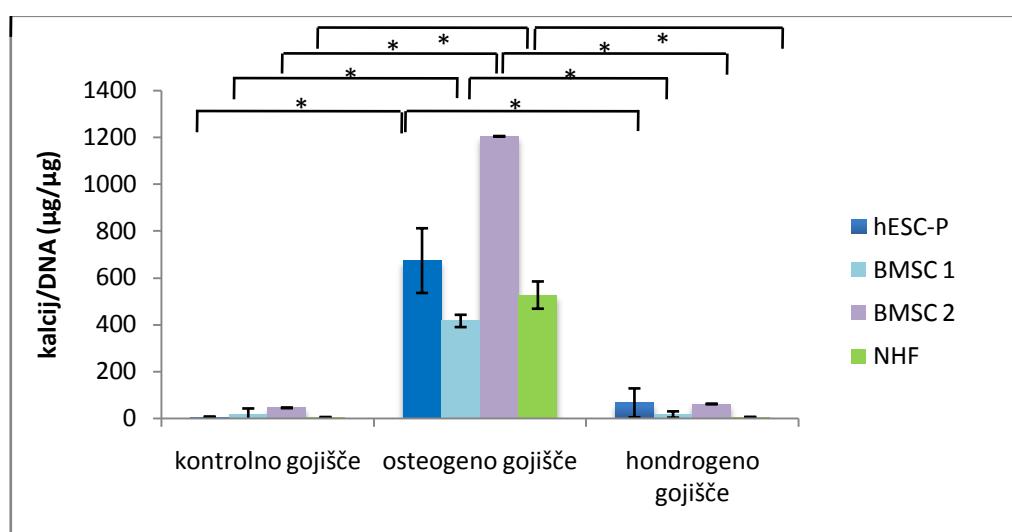
Peleti hESC-P ter BMSC so po 4 tednih kultivacije v osteogenem gojišču vsebovali mineraliziran matriks (**Slika 37**). Pozitiven rezultat barvanja Von Kossa (VK) so črno obarva področja, ki so povezana z mesti nalaganja kalcija. Nasprotno peleti, ki smo jih gojili v kontrolnem gojišču, niso bili pozitivni po barvanju VK. Pozitivno reakcijo smo zaznali tudi pri negativni kontroli NHF, ki smo jih gojili v osteogenem gojišču.



Slika 37: Barvanje Von Kossa histoloških rezin iz peletov po 4-tedenski kultivaciji v osteogenem in hondrogenem gojišču

4.2.2.2.2 Vsebnost kalcija v peletih

Prisotnost mineraliziranega matriksa smo potrdili tudi biokemijsko z merjenjem vsebnosti kalcija. Izmerjeno količino kalcija smo normalizirali na velikost peleta ter izrazili kot količino kalcija na DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$). Pri vseh skupinah celic (hESC-P, BMSC 1, BMSC 2 ter NHF) je bila pri peletih, ki smo jih gojili v osteogenem gojišču, vsebnost kalcija statistično značilno večja v primerjavi s peleti iz hondrogenega ter kontrolnega gojišča (**Slika 38**). Vsebnost kalcija v osteogenem gojišču je bila najvišja v peletih iz BMSC 2, najnižja pa pri peletih iz BMSC 1. Vrednost kalcija v peletih hESC-P je bila primerljiva z vrednostima pri BMSC. Povišano vrednost kalcija smo izmerili tudi pri peletih NHF v osteogenem gojišču (**Slika 38**).

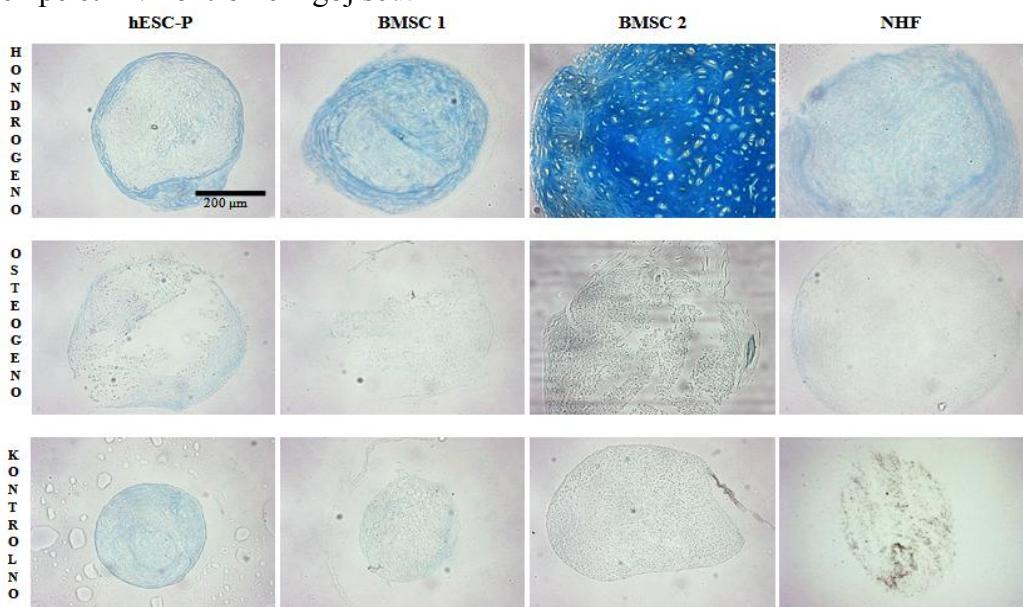


Slika 38: Izmerjene količine kalcija, normalizirane na količino DNA v kontrolnem, osteogenem in hondrogenem gojišču pri različnih celičnih tipih ($n = 5-6$ za hESC-P in NHF, $n = 4-5$ za BMSC 1 ter $n = 5$ za BMSC 2). Zvezdica označuje statistično pomembno razliko med skupinama ($p < 0,05$).

4.2.2.3 Preverjanje hondrogenega potenciala

4.2.2.3.1 Barvanje z alcianskim modrilom

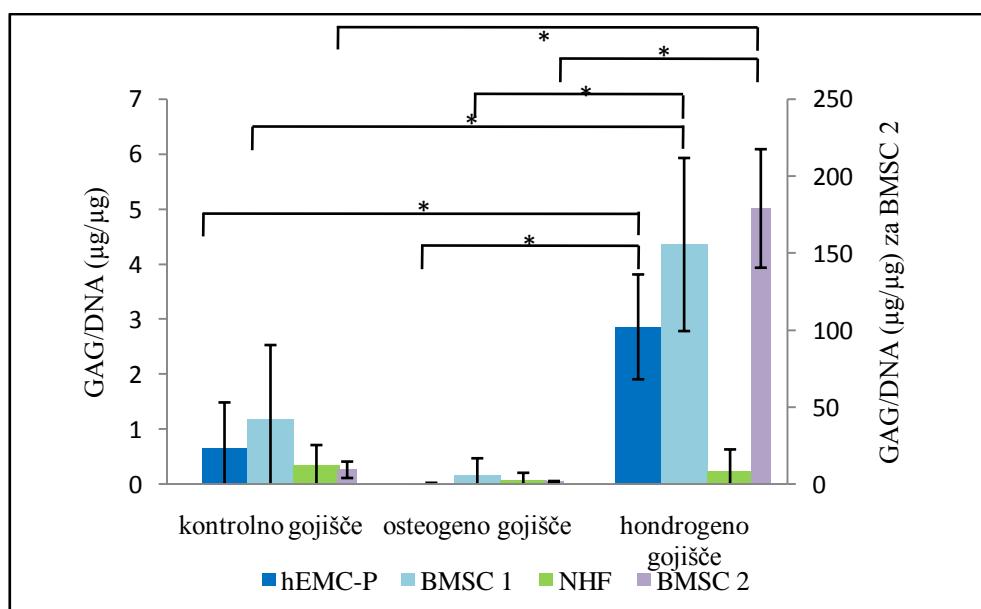
Alciansko modrilo se specifično veže na negativno nabite mukopolisaharide in glikozaminoglikane. Peleti hESC-P, gojeni v hondrogenem gojišču, so bili v primerjavi s peleti BMSC šibko pozitivno obarvani, kar nakazuje, da sicer imajo hondrogen potencial, a je le-ta v primerjavi z BMSC manjši (Slika 39). Velika razlika v intenziteti obarvanja pri BMSC 1 in 2 kaže na to, da je hondrogeni potencial BMSC variabilen ter se razlikuje med celicami različnih donorjev. Rahlo pozitivno obarvanje smo zaznali tudi v zunanjem predelu peletov NHF, gojenih v hondrogenem gojišču, negativno barvanje pa smo zaznali pri vseh peletih v kontrolnem gojišču.



Slika 39: Histološke rezine iz peletov, obarvane z alcianskim modrilom. Pozitivna reakcija je modre barve. Slike so posnete pri 100-kratni povečavi.

4.2.2.3.2 Vsebnost glikozaminoglikanov v peletih

Peleti iz hESC-P so v hondrogenem gojišču kopičili glikozaminoglikane (GAG), ki so eden od indikatorjev hondrogene diferenciacije. V osteogenem in kontrolnem gojišču je bila koncentracija glikozaminoglikanov statistično značilno nižja od količine GAG v hondrogenem gojišču (**Slika 40**) ($p<0,05$). Vsebnost GAG pri peletih iz hESC-P je bila primerljiva z GAG pri BMSC 1 v hondrogenem gojišču, medtem ko je bila vsebnost GAG pri BMSC 2 kar 30-krat višja kot pri BMSC 1, kar kaže na veliko variabilnost populacij BMSC. Pri NHF ni bilo povišanega kopičenja GAG v primerjavi s kontrolnim gojiščem.

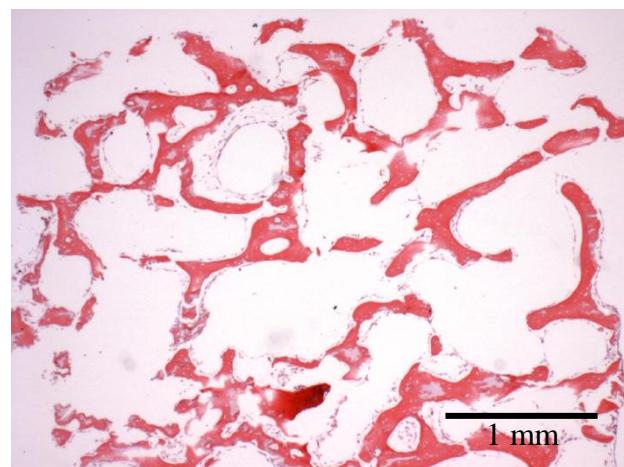


Slika 40: Izmerjene vrednosti GAG, normalizirane na količino DNA, v kontrolnem, osteogenem in hondrogenem gojišču pri različnih celičnih tipih ($n = 3-5$ za hESC-P in BMSC 1; $n = 5-6$ za NHF; $n = 5-6$ za BMSC 2). Zvezdica označuje statistično pomembno razliko med skupinama ($p<0,05$).

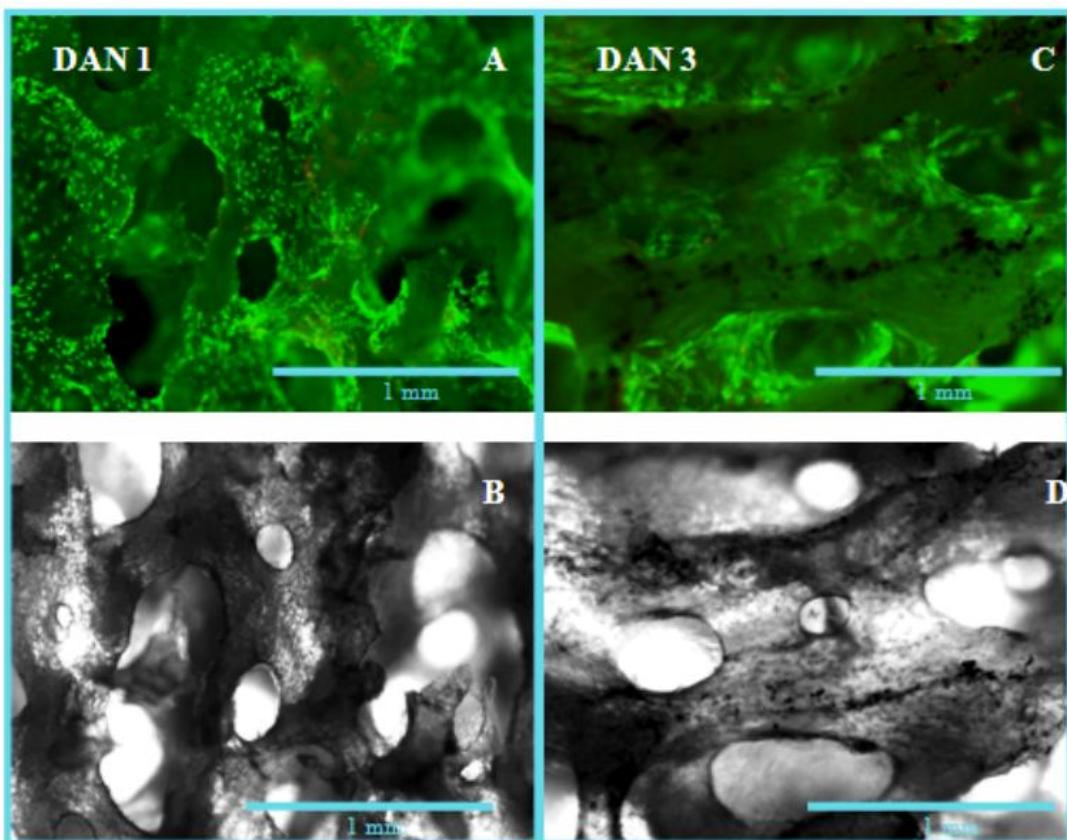
4.3 NASADITEV IN PREŽIVETJE HESC-P NA NOSILCIH IZ DECELULARIZIRANE GOVEJE KOSTI

4.3.1 Razporeditev in živost celic v konstruktih

Celice so en dan po nasaditvi enakomerno razporejene po nosilcu (**Slika 41**), velika večina jih je bila živih tudi v notranjosti nosilca (**Slika 42 A**). Tudi 3 dni po nasaditvi na nosilec so bile celice enakomerno razporejene in v veliki večini žive, ter so imele nekoliko podaljšano obliko, kar kaže, da so se uspešno pritrstile na nosilec (**Slika 42 C**).



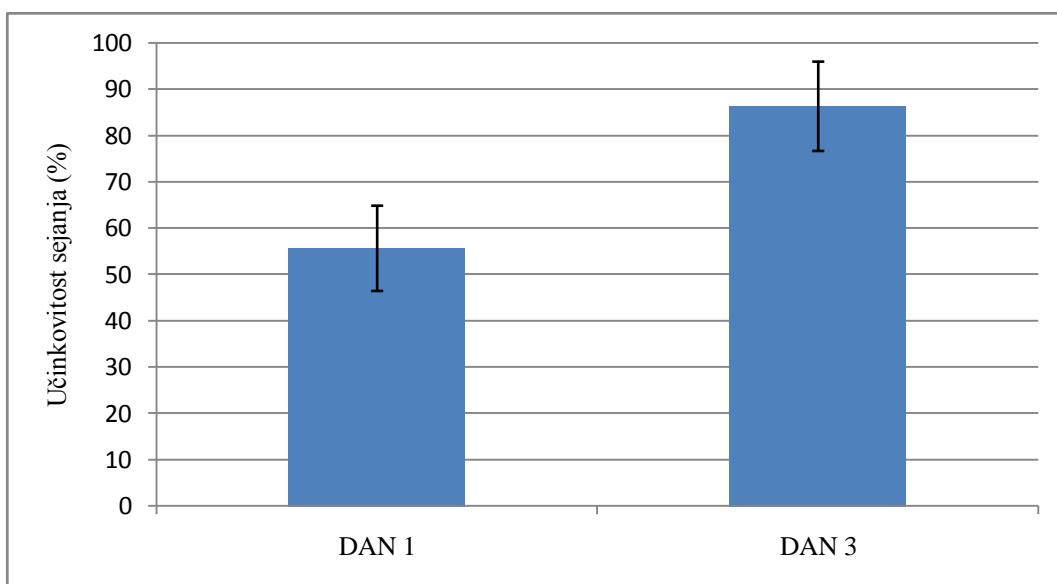
Slika 41: Razporeditev celic v notranjosti nosilca. Celice so za boljšo vidljivost obarvane s hematoksilinskim barvilom. 20-kratna povečava.



Slika 42: Ocena živosti celic 1 in 3 dni po nasaditvi na nosilec. Z zeleno so obarvane žive celice, z rdečo pa mrtve. Barvne slike so bile posnete z uporabo fluorescence, črno-bele pa s faznim kontrastom. Vse slike so bile posnete pri 40-kratni povečavi.

4.3.2 Učinkovitost nasaditve celic hESC-P na nosilec (angl. Seeding Efficiency)

Učinkovitost nasaditve celic hESC-P na nosilec iz decelularizirane kosti je bila 55 % na dan 1 ter 86 % na dan 3 (**Slika 43**). Iz rezultatov predvidevamo, da se je na dan 1 po sejanju približno polovici celic (750.000 celic) uspelo zadržati v nosilcu, ostale pa so izplavale, ko smo konstruktu dodali svež medij. Do dneva 3 so se celice uspešno pritrstile na nosilec ter se že pričele podvojevati. Približno 30 % vseh celic v nosilcu se je podvojilo, saj se je učinkovitost sejanja iz 55 % povečala na 86 %.



Slika 43: Učinkovitost nasaditve hESC-P na nosilec. Učinkovitost sejanja je izražena kot kvocient med številom celic na posamezen dan in začetnim številom celic (n = 4).

Preglednica 14: Izmerjene količine DNA za izračun učinkovitosti sejanja hESC-P na nosilec

	hESC-P dan 0	hESC-P + nosilec dan 0	hESC-P + nosilec dan 1	hESC-P + nosilec dan 3
koncentracija DNA (ng/ml)	6824,60	6799,91	3786,11	5870,47
standardni odklon	267,28	744,54	625,68	655,45

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

hESC predstavljajo količinsko neomejen vir celic za uporabo v regenerativni medicini. Praktična uporaba hESC temelji na razvoju enostavnih in učinkovitih protokolov za usmerjeno diferenciacijo celic. Pridobljena populacija mora biti uniformna, enostavna za kultivacijo, mora preživeti *in vivo* transplantacijo in tvoriti funkcionalno tkivo brez tveganja nastanka tumorjev.

V študiji smo celostno okarakterizirali hESC-P, ki smo jih predhodno pridobili iz s serumom inducirane hESC linije H9 v mezodermalno usodo.

Protokol za usmerjeno diferenciacijo hESC je enostaven, ne temelji na kokultivaciji z drugimi celicami živalskega izvora (Barberi in sod., 2005) ter ne vključuje priprave embrioidnih teles (Hwang in sod., 2008). Prednost izpustitve EB koraka je v tem, da so EB heterogena populacija tako v velikosti kot v sestavi, kar vpliva na ponovljivost metode (Mateizel in sod., 2008). Protokol temelji na monoslojnem pristopu, edini indukcijski faktor pa je fetalni telečji serum.

Zastavljena karakterizacija celic je obsegala opazovanje morfologije in dinamike rasti hESC-P skozi podaljšano gojenje, preverjanje njihovega diferenciacijskega potenciala *in vitro* ter ugotavljanje sposobnosti celic, da se v osteogenih pogojih uspešno pritrdirjo na nosilec in proliferirajo, kar je predpogoj za prenos v *in vivo* okolje ali za nadaljnjo kultivacijo v bioreaktorskem sistemu.

Novost v naši študiji je *in vitro* ekspanzija celic, pridobljenih iz embrionalne linije H9, primerjava diferenciacijskega potenciala hESC-P z BMSC dveh različnih darovalcev ter z NHF in nasaditev na biorazgradljiv nosilec v kombinaciji s faktorji, ki vzpodbuju osteogeno diferenciacijo.

S primerjavo morfologije hESC-P in BMSC smo ugotovili, da imajo hESC-P med gojenjem podaljšano, fibroblastom podobno obliko, ki je podobna obliki BMSC (**Slika 28**). Skozi podaljšano gojenje so hESC-P ohranile isto dinamiko rasti (**Slika 13**) in se morfološko niso bistveno spreminjale skozi naraščajoče pasaže (**Slike 14-27**). V teoriji bi lahko po 40 dneh kultivacije hESC-P namnožili do 5×10^{11} celic, kar je zadostno število za regeneracijo večje poškodbe kosti. Za nastanek 1 cm³ nove kosti je potrebno približno 70 x 10⁶ osteoblastov (Muschler in sod., 2004).

V 40 dneh se je populacija hESC-P 20-krat podvojila (12 pasaž) ter pri tem ohranila morfološke značilnosti. V nadalnjih raziskavah bi bilo potrebno preveriti tudi stabilnost kariotipa hESC-P med podaljšanim gojenjem. MSC lahko v *in vitro* pogojih kultiviramo omejeno dolgo; 8-15 pasaž, kar ustrezava 25-40 populacijskim podvojitvam. Če jih gojimo še naprej, dobijo veliko in ploščato obliko, postanejo senescentne ter se nehajo podvojevati (DiGirolamo in sod., 1999). Mateizel in sod. (2008) so za diferenciacijo humanih embrionalnih linij VUB01 in VUB02 uporabili podoben diferenciacijski protokol, pridobljene celice pa so ohranile fibroblastno morfologijo in stabilen kariotip skozi vsaj 18 pasaž.

Pri testiranju diferenciacijskega potenciala hESC-P smo ugotovili, da imajo celice močan osteogen potencial, niso pa bile močno odzivne na indukcijo hondrogene in adipogene diferenciacije. Sklepamo, da so hESC-P unipotentne. Pri BMSC smo potrdili multipotenten diferenciacijski potencial (Pittenger in sod., 1999).

Po 4 tednih kultivacije hESC-P v gojišču z dodanimi osteogenimi suplementi (Jaiswal in sod., 1997) smo uspešnost diferenciacije ocenili s parametri, ki definirajo zrel osteoblastni fenotip: aktivnost alkalne fosfataze, nalaganje mineralov ter izražanje transkripcijskega faktorja Cbfa-1/Runx-2.

Alkalna fosfataza ni specifična za kostno tkivo, vendar je visoko izražanje kostno-jetrnoleđvične različice alkalne fosfataze pomemben zgodnji marker osteogeneze (Rodan in Rodan, 1988). Osteoprogenitorske celice ne izražajo AP, aktivnost alkalne fosfataze se nato povečuje z napredovanjem osteogeneze ter doseže vrh v osteoblastni fazi, pri osteocitih, najvišji diferencijski stopnji osteoblastne linije, pa je aktivnost alkalne fosfataze nekoliko zmanjšana (Aubin in sod., 1998; Jaiswal in sod., 1997). Skozi štiri tedensko kultivacijo v osteogenem gojišču se je AP aktivnost pri hESC-P iz tedna v teden povečevala (**Slika 30**). Celice, ki so bile AP pozitivne, smo opazili od prvega tedna indukcije. V primerjavi z referenčnima BMSC kulturama so bile hESC-P na začetku osteogene indukcije nekoliko manj odzivne kot BMSC, v tednu 3 in 4 pa so tako hESC-P kot BMSC 1 in BMSC 2 izražale močno encimsko aktivno AP (**Slika 30**). Sklepamo, da so hESC-P ter BMSC v tednu 4 dosegle zrel osteoblasten fenotip.

Cbfa-1/Runx-2 je transkripcijski faktor, ki se aktivira, ko nastopi osteogeneza in velja za robusten marker osteogene usmerjenosti (Ducy, 2000). Analize miši, pri katerih se gen za Cbfa-1 ne izraža (angl. knock-out), so pokazale, da Cbfa-1 regulira skupino za osteoblaste-specifičnih genov ter da je posledica njegove odsotnosti prekinitev diferenciacije v osteoblastno linijo (Karsenty, 2000). Analize izražanja mRNA v osteogenem in kontrolnem gojišču pri tednu 1, 2, 3 in 4 niso pokazale povisane regulacije Cbfa-1 pri hESC-P, prav tako ne pri referenčnih BMSC 1 in BMSC 2, negativna kontrola NHF pa je imela celo nekoliko povisano izražanje Cbfa-1 v osteogenem gojišču, kar je nepričakovani rezultat (**Slika 32**). Glede na to, da smo dobili nepričakovane rezultate tudi pri pozitivnih in negativnih kontrolah, sklepamo, da Cbfa-1 sicer uravnava gene, povezane z napredovanjem osteogeneze, vendar njegovo izražanje ne sovpada z napredovanjem diferenciacije. Dodatno bi bilo potrebno preveriti tudi izražanje genov, ki jih Cbfa-1 uravnava s svojo vezavo na promotor, naprimer osteokalcin. Frank in sod. (2002) so ugotovili, da se je pri BMSC izražanje Cbfa-1 s časom 20-dnevne kultivacije v osteogenem gojišču povečevalo le v manjši meri (do 5-kratno relativno povečanje izražanja), izražanje pa je bilo tudi visoko variabilno med različnimi darovalci. Tudi Pittenger in sod. (1999) so izmerili povečano izražanje Cbfa-1 v nediferenciranih BMSC ter v celicah, ki so jih diferencirali v druge mezenhimalne linije, zato so ocenili, da Cbfa-1 ni dober marker za opazovanje napredovanja osteogene diferenciacije.

Končni označevalec osteoblastne diferenciacije je tvorba mineraliziranega ekstracelularnega matriksa (ECM). *In situ* je ECM sestavljen iz organske in anorganske komponente. Organsko komponento ECM sestavlja v glavnem kolagen tipa I z manjšimi količinami drugih nekolagenih proteinov, od katerih je najbolj specifičen osteokalcin.

Glavna anorganska komponenta kosti pa je mineraliziran kalcijev fosfat ali z drugim imenom, s karbonati-substituiran hidroksiapatit (Heng in sod., 2004). Nastajanje mineraliziranega ECM skozi čas diferenciacije smo opazovali z barvanjem Von Kossa. Srebrov nitrat iz barvila Von Kossa ne reagira direktno s kalcijem v ECM, ampak s fosfati v prisotnosti kisline. Območja v tkivu, ki so bogata s karbonati in fosfati, so nespremenljivo povezana z območji nalaganja kalcija. Barvanje Von Kossa se zaradi svoje enostavnosti ter nizke cene pogosto uporablja za detekcijo mineralizacije v tkivnih kulturah. Celice hESC-P so po 4 tednih kultivacije v osteogenem okolju močno mineralizirale, pričetek tvorbe mineraliziranega matriksa je bil najbolj očiten po tednu 3 in 4 (**Slika 31**). V kontrolnem gojišču nismo zaznali pozitivne reakcije, črnoobarvanih področij nalaganja kalcija. Mineralizacija je bila uspešna tudi pri obeh referenčnih tipih BMSC, kalcificiranega matriksa pa je bilo glede na rezultat barvanja več pri hESC-P kot pri BMSC, kar nakazuje, da imajo hESC-P visoko mineralizacijsko sposobnost. Ponekod smo pozitiven rezultat zaznali tudi pri negativni kontroli NHF, kar je bilo še posebej očitno pri peletih NHF v osteogenem gojišču po 4 tednih kultivacije (**Slika 37**).

In vitro študije kultivacijskih sistemov so pokazale, da pozitivno barvanje Von Kossa ni zadosten dokaz za identifikacijo mineralizirane faze (Bonewald in sod., 2003) zaradi možnosti distrofične mineralizacije in da je dodatno potrebna analiza minerala še z drugimi tehnikami, kot so difrakcija z rentgenskimi žarki ali Fourierjeva transformacijska infrardeča spektroskopija (angl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR). Uporaba 10 mM β -GP v gojišču, enako koncentraciji tega osteogenega suplementa smo uporabljali tudi v naši študiji, je povezana z višjo stopnjo distrofične mineralizacije (Bonewald in sod., 2003).

hESC-P so bile le šibko odzivne na adipogeno indukcijo. Akumulacija lipidov je indikator razvoja celic v zrele adipocite. Po barvanju celic z barvilm Oil Red O, ki rdeče obarva trigliceride, smo opazili zelo šibko obarvanje majhnih maščobnih vakuol pri hESC-P, ki je bilo v primerjavi z velikimi lipidnimi vakuolami pri BMSC komaj zaznavno. RT-PCR analiza adipogenega označevalca PPAR γ ni pokazala povišanega izražanja v času adipogene indukcije pri hESC-P, medtem ko smo pri BMSC zaznali povišano izražanje PPAR γ med tretiranjem celic z gojiščem za indukcijo adipogeneze (**Slika 34**, teden 2). PPAR γ je transkripcijski faktor in velja za glavnega regulatorja adipogeneze (Muruganandan in sod., 2008). Deluje kot heterodimer z retinoidnim X receptorjem in se veže na PPAR-odzivno regijo tarčnih genov. Za dodatno preverjanje adipogenega potenciala hESC-P predlagamo ponovno indukcijo adipogeneze po tretjem tednu gojenja. Zanimivo bi bilo tudi tretiranje celic med diferenciacijo z rosiglitazonom, ki je PPAR γ agonist. Xiong in sod. (2005) so pokazali, da rosiglitazon spodbuja adipogeno diferenciacijo hESC.

Kulture iz peletov in mikromas so zaradi 3D celičnih interakcij pogosto uporabljeni za učinkovito hondrogeno MSC (Mackay in sod., 1998) in predniških celic, pridobljenih iz hESC (Hwang in sod., 2006). Merjenje količine DNA v peletih je pokazalo statistično značilno povečanje DNA v peletih v hondrogenem gojišču le pri BMSC 2 (**Slika 36**). Opažene razlike v velikosti peletov so tako v večji meri posledica povečane količine ekstracelularnega matriksa, ki nastaja med hondrogeno stimulacijo ob prisotnosti citokina TGF β -3 v gojišču (**Slika 35**). Podobno so v svoji študiji opazili tudi Hwang in sod. (2006).

Hondrogen potencial hESC-P v kulturi peletov je ostal omejen; v hondrogenem gojišču smo zaznali le šibko pozitivno obarvanje z alcianskim modriliom v zunanjih predelih peleta (**Slika 39**). Neenakomerno obarvanje peletov z alcianskim modriliom je najverjetneje posledica tega, da so hESC-P nekoliko heterogena populacija celic, ki se na pogoje kultivacije različno odzivajo. Kvantifikacija glikozaminoglikanov (GAG) v peletih po 4 tednih je pokazala povečano količino GAG/DNA pri hESC-P v hondrogenem v primerjavi s kontrolnim gojiščem, vendar je bila le-ta v primerjavi s količino GAG/DNA pri BMSC2 zanemarljivo majhna (**Slika 40**).

Opazili smo velike razlike med nekaterimi meritvami pri BMSC 1 in BMSC 2. Razlike so bile najbolj očitne v količini GAG v peletih, kjer je bila razlika v vrednostih med obema populacijama celic v hondrogenem gojišču kar 30-kratna (**Slika 40**). Velika razlika je bila tudi v intenziteti barvanja z alcianskim modriliom (**Slika 39**). Zaključimo lahko, da je vpliv donorja (starost, spol, genetski dejavniki itn.) na sposobnost diferenciacije BMSC zelo velik.

Visoke celične gostote spodbujajo tvorbo mineraliziranega matriksa, saj se tudi v razvoju kosti osifikacija začne na mestu mezenhimskeh kondenzacij (Fröhlich in sod., 2009). Pri celicah, ki smo jih gojili v kulturi peletov v osteogenih pogojih, je bilo barvanje Von Kossa bolj intenzivno kot v monoslojih (**Slika 37**). Določanje celokupne koncentracije kalcija po 4 tednih kultivacije je potrdilo višjo vsebnost kalcija pri hESC-P v osteogenem v primerjavi s kontrolnim gojiščem (**Slika 38**).

Negativno kontrolo v naši študiji je predstavljala primarna celična kultura normalnih humanih fibroblastov (NHF), za katero velja, da je terminalno diferenciran celični tip vezivnega tkiva. Zaradi svoje lahke dostopnosti ter prisotnosti v različnih tkivih so fibroblasti pogosto uporabljen celični tip v bioloških eksperimentih. Rezultati merjenja celokupne koncentracije kalcija (**Slika 38**) ter barvanje Von Kossa (**Slika 37**) pri peletih so pokazali, da so tudi NHF med 4-tedensko kultivacijo v osteogenem mediju kopile kalcij, ki je eden od parametrov osteogene diferenciacije, česar nismo pričakovali. Poskus s fibroblasti smo zaradi izključitve možnosti napake ponovili v dveh neodvisnih eksperimentih ter v obeh primerih dobili enak rezultat (neobjavljeni podatki). Sudo in sod. (2007) so proučevali 25 različnih humanih primarnih fibroblastnih populacij ter ugotovili, da večina populacij iz različnih humanih tkiv (pljuča, koža in popkovina) vsebuje tudi celice, ki so se sposobne diferencirati v vsaj eno mezenhimsko linijo, vključno z osteoblasti, hondrocyti in adipociti. V kar 19 populacijah izmed 25 testiranih so opazili osteogeno diferenciacijo, v nekaterih pa tudi hondrogeno in adipogeno. Sudo in sod. (2007) zato predlagajo, da se v primarnih fibroblastnih celičnih kulturah nahajo tudi mezenhimske predniške in matične celice. Drugi možen razlog za pridobljene rezultate je že prej omenjena distrofična mineralizacija. AP aktivnost je neodvisen indikator osteogene diferenciacije, pri NHF je bilo barvanje AP v osteogenih pogojih negativno, vendar smo opazili redke posamezne celice, ki so bile AP pozitivno obarvane (**Slika 30**).

Glede na to, da smo poleg močnega osteogenega potenciala hESC-P zaznali le zelo šibek hondrogen in adipogen potencial, hESC-P najverjetneje niso popolnoma uniformna populacija celic, ampak so med večino celic, ki imajo samo osteogen potencial tudi določene celice, ki so ohranile hondrogen in/ali adipogen potencial. Muraglia in sod.

(2000) je ugotovil, da multipotentna predniška celica iz kostnega mozga najprej izgubi adipogen, nato hondrogen, nazadnje pa še osteogen diferenciacijski potencial, kar sovpada z našimi rezultati. Muraglia in sod. (2000) predlaga, da populacijo BMSC sestavljajo mezenhimske matične in predniške celice z uni-, bi- in multipotentnim značajem. Za dokončno potrditev te hipoteze pri hESC-P bi morali posamezne hESC-P klonalno namnožiti in testirati njihov diferenciacijski potencial.

V nadalnjih raziskavah predlagamo optimizacijo diferenciacijskih gojišč, s čimer bomo lahko dokončno preverili sposobnost diferenciacije hESC-P v hondrogen in adipogen fenotip.

Predmet proučevanja v tekočih raziskavah je tudi analiza izražanja površinskih antigenov pri hESC-P s pretočno citometrijo. hESC-P, pridobljene v predhodnih študijah (Barberi in sod., 2005; Mateizel in sod., 2008) izražajo podobne površinske označevalce kot MSC (**Preglednica 4**). Vendar pa je tako kot pri MSC tudi pri hESC-P potrebno celice ovrednotiti funkcionalno, z opazovanjem sposobnosti celic, da se uspešno pritrdijo na plastiko in s testiranjem diferenciacijskega potenciala (Dominici in sod., 2000).

Primeren biomaterial, ki podpira pritrjevanje, proliferacijo ter diferenciacijo celic v željeni celični tip, je ključen za uspešno regeneracijo tkiva (Hwang in sod., 2006). V naši študiji smo za celični nosilec uporabili govejo decellularizirano kost. Martin in sod. (1999) je pokazal osteoinduktivne lastnosti nosilca, njegove prednosti pa so še ugodne mehanske lastnosti ter idealna poroznost. Nasaditev celic hESC-P na nosilec na dan 1 je bilo $55,7 \pm 9,2\%$ učinkovito (**Slika 43**), skoraj vse celice v nosilcu so bile viabilne (**Slika 42**), po treh dneh pa so se uspešno pritrdile ter že začele deliti, saj se je učinkovitost sejanja povečala na $86,3 \pm 9,6\%$. (**Slika 43**). V predhodni študiji (Grayson in sod., 2008) je bila uspešnost sejanja BMSC na nosilec iz decellularizirane kosti takoj po nasaditvi 28,1 %. Celice, ki so ostale na nosilcu, so bile razporejene po površini nosilca enakomerno (**Slika 41**). Iz rezultatov nasaditvene študije lahko zaključimo, da je bila izbira decellularizirane kosti kot biomaterijala primerna, saj omogoča preživetje, pritrditev in rast hESC-P, kar so vzpodbudni rezultati za nadaljnje študije osteogenega potenciala *in vitro* v bioreaktorskem sistemu ter *in vivo* z implantacijo na mesto poškodbe v modelnega sesalca.

V nadalnjem delu se nameravamo osredotočiti na osteogen potencial hESC-P ter gojiti celice hESC-P na nosilcu iz decellularizirane kosti v bioreaktorskem sistemu. V kosteh omogoča izmenjavo hrani, kisika ter odpadnih snovi med metabolično aktivnimi osteociti intersticijski tok, ki deluje tudi kot vir hidrodinamičnih strižnih sil. Zato predlagamo uporabo bioreaktorskega sistema s perfuzijo, saj je znano, stalen pretok medija skozi konstrukt omogoča bolj enakomerno preživetje celic in homogeno razporeditev novega kostnega matriksa kot gojenje v statičnih pogojih (Meinel in sod., 2004). V kombinaciji s kultivacijo celic v perfuziji predlagamo tudi optimizacijo osteogenega medija, npr. dodajanje bFGF in BMP-2, za katera je znano, da močno spodbujata osteogeno diferenciacijo pri MSC (Hanada in sod., 1997). Nenazadnje predlagamo tudi presaditev hESC-P ter diferenciranih tkivnih konstruktov v SCID miš, da dokončno izključimo možnost nastanka teratomov *in vivo*.

SKLEPI

Zaključimo lahko, da imajo iz humanih embrionalnih matičnih celic pridobljene predniške celice (hESC-P) unipotenten diferenciacijski potencial in sposobnost podaljšane rasti v kulti. Morfološko so podobne in imajo podobno dinamiko rasti kot BMSC. Sposobne so *in vitro* diferenciacije v zrel osteoblastni fenotip ter nalaganja mineraliziranega ekstracelularnega matriksa. Pri sejanju na nosilec iz decellularizirane goveje kosti se nanj uspešno pritrdijo, enakomerno razporedijo po površini nosilca ter pri tem ostanejo viabilne. Po 3 dneh kultivacije na nosilcu v osteogenih pogojih se začnejo podvojevati. Na podlagi pridobljenih rezultatov so hESC-P potencialno primerne za uporabo v tkivnem inženirstvu kosti.

6 POVZETEK

Človeške embrionalne matične celice (hESC) predstavljajo količinsko neomejen vir univerzalnih celic za uporabo v regenerativni medicini in tkivnem inženirstvu. Njihov pluripotenten značaj jim omogoča, da se teoretično lahko razvijejo v katerikoli celični tip v našem telesu. Spontana diferenciacija hESC po presaditvi v miši s sindromom hude kombinirane imunske pomankljivosti privede do nastanka teratomov, tumorjev, ki so sestavljeni iz različni mezo-, endo- in ektodermalnih derivatov. Praktična uporaba hESC temelji na razvoju enostavnih in učinkovitih protokolov za usmerjeno diferenciacijo celic. Pridobljena populacija mora biti uniformna, enostavna za kultivacijo, mora preživeti *in vivo* transplantacijo in tvoriti funkcionalno tkivo brez tveganja nastanka tumorjev. Eno od področij, kjer bi se lahko uporabljale celice, diferencirane iz hESC, je tudi rekonstrukcija večjih poškodb hrustanca in kosti.

Mezenhimske matične celice (MSC) so izolirali iz različnih odraslih mezenhimskih tkiv, njihov terapevtski potencial pa je zaradi višje varnosti pri uporabi velik. Glavni problem pri uporabi MSC v kliničnih aplikacijah je majhno število celic, ki jih lahko pridobimo iz enega donorja, ter omejena sposobnost proliferacije celic *in vitro*. Po drugi strani imajo hESC neomejen proliferacijski potencial *in vitro*, z usmerjeno diferenciacijo hESC v mezenhimsko usodo pa bi lahko pridobili neomejene količine mezenhimskih prednic, ki bi jih lahko diferencirali v različna mezenhimalna tkiva, pri čemer ne bi prišlo do nastanka teratomov. Razumevanje diferenciacije hESC po korakih do mezenhimske usode je tudi pomembno orodje razvojne biologije ter molekularnih mehanizmov kontrole nastanka mezoderma in mezodermalne specifikacije pri človeku.

V študiji smo okarakterizirali predniške celice, pridobljene iz humanih embrionalnih matičnih celic (hESC-P) za namen uporabe v tkivnem inženirstvu. Preverili smo njihove morfološke značilnosti, vpliv podaljšanega gojenja na celični fenotip in morfologijo ter diferenciacijski potencial celic za tvorbo nekaterih mezenhimskih tkiv (kost, hrustanec in maščobno tkivo) v monoslojni (2D) kulturi ter v enostavnih tridimenzionalnih (3D) pogojih, kulturi peletov. Pozitivna kontrola v naših raziskavah sta bili dve populaciji odraslih mezenhimskih matičnih celic iz kostnega mozga, negativna kontrola pa primarni humani fibroblasti. Ker so hESC-P pokazale močan osteogen potencial, smo jih v nadaljevanju poskusov nasadili na celični nosilec iz decellularizirane goveje kosti in preverili njihovo sposobnost pritrditve in preživetja na biološkem nosilcu.

Rezultati so pokazali, da imajo hESC-P v kulturi podaljšano, fibroblastno obliko, in so morfološko podobne mezenhimskim matičnim celicam iz kostnega mozga. Skozi podaljšano gojenje (do dvanajste pasaže) so hESC-P ohranile isto dinamiko rasti in se morfološko skozi različne pasaže niso spreminjače. Pri testiranju diferenciacijskega potenciala hESC-P smo ugotovili, da imajo celice močan osteogen potencial, niso pa bile dobro odzivne na hondrogeno in adipogeno indukcijo diferenciacije. Sklepamo, da imajo hESC-P sposobnost daljše rasti v kulturi ter da so unipotentne, osteogene predniške celice.

Osteogen potencial smo ugotovili pri gojenju v 2D pogojih z merjenjem encimske aktivnosti alkalne fosfataze ter z barvanjem Von Kossa. Aktivnost alkalne fosfataze ter intenziteta obarvanja Von Kossa sta skozi teden 1, 2, 3 in 4 naraščala. Dodatno smo z RT-PCR preverjali izražanje osteogenega označevalca Cbfa-1. V kulturah peletov (3D okolje)

so hESC-P po štirih tednih gojenja v osteogenem gojišču nakopičile kalcij, ki smo ga ugotovili z biokemijsko metodo merjenja celokupne koncentracije kalcija ter z barvanjem histoloških rezin peletov po barvanju Von Kossa. Hidrogen potencial smo preverjali v kulturi peletov z barvanjem histoloških rezin z alcianskim modrilm in z merjenjem koncentracije glikozaminoglikanov. Adipogen potencial smo preverjali v monoslojnih kulturah z metodo barvanja Oil Red O ter merjenjem izražanja označevalca adipogeneze PPAR γ z metodo RT-PCR.

hESC-P smo nasadili na nosilce iz decellularizirane kosti ter ugotavljali učinkovitost nasajevanja celic z merjenjem vsebnosti DNA (merilo za število celic v konstraktu) in viabilnost celic s kvalitativnim testom LIVE/DEAD. Ugotovili smo, da so se hESC-P na nosilec uspešno pritrstile, večina celic znotraj nosilca je bila viabilnih, po treh dneh pa so se celice pričele tudi razmnoževati po površini nosilca. Na osnovi ugotavljanja rastnih karakteristik, diferenciacijskega potenciala in sposobnosti rasti na izbranem celičnem nosilcu sklepamo, da so hESC-P potencialno uporabne v tkivnem inženirstvu za regeneracijo kosti.

7 VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

- Ahn S. E., Kim S, Park K. H., Moon S. H., Lee H. J., Kim G. J., Lee Y. J., Cha K. Y., Chung H. M. 2006. Primary bone-derived cells induce osteogenic differentiation without exogenous factors in human embryonic stem cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 340, 2: 403-408
- Aubin J. E. 1998. Advances in osteoblast lineage. Biochemistry and Cell Biology, 76, 6: 899-910
- Barberi T., Studer L. 2006. Differentiation of embryonic stem cells: mesenchymal cells. Methods in Enzymology, 418, 12: 194-208
- Barberi T., Willis L. M., Soccia N. D., Studer L. 2005. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. PLoS Medicine, 2, 6: 554-560
- Bauwens C. L., Peerani R., Niebruegge S., Woodhouse K. A., Kumacheva E., Husain M., Zandstra P. W. 2008. Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories. Stem Cells, 26, 9: 2300-2310
- Baxter M. A., Wynn R. F., Jowitt S. N., Wraith J. E., Fairbairn L. J., Bellantuono I. 2004. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following *in vitro* expansion. Stem Cells, 22, 5: 678-682
- Bellows C. G., Heersche J. N., Aubin J. E. 1990. Determination of the capacity for proliferation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. Developmental Biology, 140, 1: 132-138
- Bianco P., Fisher L. W., Young M. F., Termine J. D., Robley P. G. 1991. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. Calcified Tissue International, 49, 6: 421-426
- Bianco P., Riminiucci M., Bonucci E., Termine J. D., Robey P. G. 1993. Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation: Relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 41, 2: 183-191
- Bielby R. C., Boccaccini A. R., Polak J. M., Butterly, L. D. K. 2004. *In vitro* differentiation and *in vivo* mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. Tissue Engineering, 10, 9/10: 1518-1524
- Biocolor Ltd. 1998. Blyscan sulfated glycosaminoglycans assay manual (27. 8. 2008)
<http://www.biocolor.co.uk/manuals/blyscan.pdf> (6. 7. 2010)

- Bonewald L. F., Harris S. E., Rosser J., Dallas M. R., Dallas S. L., Camacho N. P., Boyan B., Boskey A. 2003. Von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization *in vitro* represents bone formation. *Calcified Bone International*, 72, 5: 537-547
- Bongso A., Richards M. 2004. History and perspective of stem cell research. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 18, 6: 827-842
- Boyd N. L., Robbins K. R., Dhara S. K., West F. D., Stice S. L. 2009. Human embryonic stem cell-derived mesoderm-like epithelium transitions to mesenchymal progenitor cells. *Tissue Engineering: Part A*, 15, 8: 1897-1907
- Boyer L. A., Lee T. I., Cole M. F., Johnstone S. E., Levine S. S., Zucker J. P., Guenther M. G., Kumar R. M., Murray H. L., Jenner R. G., Gifford D. K., Melton D. A., Jaenisch R., Zoung R. A. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122, 6: 947-956
- Brown S. E., Tong W., Krebsbach P. H. 2009. The derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs*, 189, 1-4: 256-260
- Broxmeyer H. E., Douglas G. W., Hangoc G., Cooper S., Bard J., English D., Arny M., Thomas L., Boyse E. A. 1989. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 10: 3828-3832
- Bruder S. P., Caplan A. I. 1990. Terminal differentiation of osteogenic cells in the embryonic chick tibia is revealed by a monoclonal antibody against osteocytes. *Bone*, 11, 3: 189-198
- 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, 8: 2396-2402
- Caplan A. I. 2010. Mesenchymal stem cells: The past, the present, the future. *Cartilage*, 1, 1: 6-9
- Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols M., Lee S., Tweedie S., Smith A. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113, 5: 643-655
- Chen F. H., Song L., Mauck R. L., Li W. J., Tuan R. S. 2000. Mesenchymal stem cells. V: *Principles of Tissue Engineering*. Lanza R., Langer R., Vacanti J. (ur.). Oxford, Elsevier academic press: 824-843
- Davies J. E. 1996. In vitro modeling of the bone/ implant interface. *The Anatomical Record*, 245, 2: 426-445

- DiGirolamo C. M., Stokes D., Colter D., Phinney D. G., Class R., Prockop D. J. 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with greatest potential to propagate and differentiate. *British Journal of Haematology*, 2, 107: 275-281
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 4, 8: 315-317
- Ducy P. 2000. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Developmental Dynamics*, 219, 4: 461-471
- Erices A., Conget P., Minguell J. J. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*, 109, 1: 235-242
- Evans, M., J., Kaufman, M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 5819: 154-156
- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 279, 5356: 1528-1530
- Frank O., Heim M., Jakob M., Barbero A., Schafer D., Bendik I., Dick W., Heberer M., Martin I. 2002. Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 85, 4: 737-746
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., Lalykina, K. S. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 3, 4: 393-403
- Fröhlich M., Warren L. G., Marolt D., Gimble J., Kregar-Velikonja N., Vunjak-Novakovic G. 2009. Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion bioreactor culture. *Tissue Engineering Part A*, 16, 1: 179-189
- Galmiche M. C., Koteliansky V. E., Briere J., Herve P., Charbord P. 1993. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*, 82, 1: 66-76
- Gilbert S. F. 2006. The early development of vertebrates: fish, birds and mammals. V: *Developmental Biology*. Gilbert S. F. (ur.). Sunderland, Massachusetts USA, Sinauer Associates, Inc.: 325-369

- Gimble J. M., Katz A. J., Bunnell B. A. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 100, 9: 1249-1260
- Godier A. F., Marolt D., Gerecht S., Tajnsek U., Martens T. P., Vunjak-Novakovic G. 2008. Engineered microenvironments for human stem cells. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews*, 84, 4: 335-347
- Grayson W. L., Bhumiratana S., Cannizzaro C., Chao P. H., Lennon D. P., Caplan A. I., Vunjak-Novakovic G. 2008. Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue engineered bone. *Tissue Engineering Part A*, 14, 11: 1809-1820
- Grayson W. L., Martens T. P., Eng G. M., Radisic M. 2009. Biomimetic approach to tissue engineering. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 6: 665-673
- Gronthos S., Graves S. E., Ohta S., Simmons P. J. 1994. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow stem cells contains the osteogenic precursors. *Blood*, 84, 12: 4164-4173
- Hanada K., Dennis J. E., Caplan A. I. 2004. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12, 10: 1606-1614
- Heng B. C., Cao T., Stanton L. W., Robsen P., Olsen B. 2004. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage *in vitro*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19, 9: 1379-1394
- Hoffman, L. M., Carpenter, M. K. 2005. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 23, 6: 699- 708
- Hwang N. S., Varghese S., Lee H. J., Zhang Z., Ye Z., Bae J., Cheng L., Elisseeff J. 2008. In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 105, 52: 20641-20646
- Hwang N. S., Varghese S., Zhang Z., Elisseeff J. 2006. Chondrogenic differentiation of human embryonic stem cell-derived cells in arginine-glycine-aspartate modified hydrogels. *Tissue Engineering*, 12, 9: 2695-2706
- Inanc B., Elcin A. E., Elcin Y. M. 2007. Effects of osteogenic induction in the *in vitro* differentiation of human embryonic stem cells cocultured with periodontal ligament fibroblasts. *Artificial Organs*, 31, 11: 792-800
- Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M., Soreq H., Benvenisty N. 2000. Differentiation of human embryonic stem cells into

embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular Medicine*, 6, 2: 88-95

Jaiswal N., Haynesworth S. E., Caplan A. I., Bruder S. P. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 64, 2: 295-312

Johnstone B., Hering T. M., Caplan A. I., Goldberg V. M., Yoo J. U. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental Cell Research*, 238, 1: 265-272

Karp J. M., Ferreira L. S., Khademhosseini A., Kwon A. H., Yeh J. 2006. Cultivation of human embryonic stem cells without the embryoid body step enhances osteogenesis in vitro. *Stem cells*, 24, 4: 835-843

Karsenty G. 2000. Bone formation and factors affecting this process. *Matrix Biology*, 19, 2: 85-89

Kindler S. J., Tsang T. E., Quinlan G. A., Hadjantonakis A. K., Nagy A., Tam, P. P. 1999. The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development*, 126, 21: 4961-4701

Kubo A., Shinozaki K., Shannon J. M., Kouskoff V., Kennedy M., Woo S., Fehling H. J., Keller G. 2004. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development*, 131, 7: 1651-1662

Langer R., Vacanti J. P. 1993. Tissue engineering. *Science*, 260, 5110: 920-926

Lee K., Deeds J. D., Bond A. T., Jüppner H., Abou-Samra A. B., Segre G. V. 1993. In situ localization of PTH/PTHrP receptor mRNA in the bone of fetal and young rats. *Bone*, 14, 3: 341-315

Lee E. J., Lee H. N., Kang H. J., Kim K. H., Hur J., Cho H. J., Lee J., Chung H. M., Cho J., Cho M. Y., Oh S. K., Moon S. Y., Park Y. B., Kim H. S. 2010. Novel embryoid body-based method to derive mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Tissue Engineering: Part A*, 16, 2: 705-715

Lee J. B., Lee J. E., Park J. H., Kim S. J., Kim M. K., Roh S. I., Yoon H. S. 2005. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum free condition. *Biology of Reproduction*, 72, 1: 42-49

Lewis J. P., Trobaugh F. E. 1964. Haematopoietic stem cells. *Nature*, 204: 589-590

Lian Q., Lye E., Yeo K. S., Khia Way Tan E., Salto-Tellez M., Liu T. M., Palanisamy N., El Oakley R. M., Lee E. H., Lim B., Lim S. K. 2007. Derivation of clinically

- compliant MSC from CD105+, CD24- differentiated human ESCs. *Stem Cells*, 25, 2: 425-436
- Lindsley R. C., Gill J. G., Kyba M., Murphy T. L., Murphy K. M. 2006. Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell- derived mesoderm. *Development*, 133, 19: 3787-3796
- Logeart-Avramoglou D., Anagnostou F., Bizios R., Petite H. 2005. Engineering bone: challenges and obstacles. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9, 1: 72-84
- Mackay A. M., Beck S. C., Murphy J. M., Barry F. P., Chickester C. O., Pittenger M. F. 1998. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Tissue Engineering*, 4, 4: 415-428
- Marolt D., Knezevic M., Vunjak Novakovic G. 2010. Bone tissue engineering with human stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 1-10
<http://stESCellres.com/content/1/2/10> (07. 07. 2010)
- Martin G. J., Boden S. D., Titus L. 1999. New formulations of demineralized bone matrix as a more effective graft alternative in experimental posterolateral lumbar spine arthrodesis. *Spine*, 24, 7: 637- 645
- Mateižel I., De Becker A., Van de Velde H., De Rycke M., Steirteghem A. V., Cornelissen R., Van der Elst J., Liebaers I., Riet I. V., Sermon K. 2008. Efficient differentiation of human embryonic stem cells into a homogeneous population of osteoprogenitor-like cells. *Reproductive Biomedicine Online*, 16, 5: 741-753
- Meinel L., Karageogiou V., Fajardo R., Snyder B., Shinde-Patil V., Zichner D., Langer R., Vunjak-Novakovic G. 2004. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: Effects of scaffold material and medium flow. *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 1: 112-122
- Miller J., 2005. Human embryonic stem cell lines. University of Wisconsin – Madison (16. 5. 2010).
http://newsroom.stESCells.wisc.edu/stESCells/images/media/Thomson_stem_colony05_10771.jpg (16. 5. 2010)
- Minguell J. J., Erices A., Conget P. 2001. Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 226, 6: 507-520
- Muneoka K., Allan C. H., Yang X., Lee J., Han M. 2008. Mammalian regeneration and regenerative medicine. *Birth Defects Research, Part C, Embryo Today*, 84, 4: 265-80
- Muschler G. F., Nakamoto C., Griffith L. G. 2004. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 86A, 7: 1541-1558

- Muraganandan S., Roman A. A., Sinal C. J. 2009. Adipocyte differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 2: 236-253
- Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science*, 113, 7: 1161-1166
- Murry C. E., Keller G. 2008. Differentiation of embryonic stem cells to clinical relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*: 132, 4: 661-680
- Olivier E. N., Rybicki A. C., Bouhassira E. E. 2006. Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24, 8: 1914-1922
- Park C., Afrikanova I., Chung Y. S., Zhang W. J., Arentson E., Fong G. G., Rosendahl A., Choi K. 2004. A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. *Development*, 131, 11: 2749-2762
- Park J. H., Kim S. J., Oh E. J., Moon S. Y., Sung I. R., Kim C. G., Yoon H. S. 2003. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biology of Reproduction*, 69, 6: 2007-2014
- Pictures of IVF embryos from our in vitro fertilization laboratory. 2010. Advanced fertility center of Chicago, Hurnee, Illinois, ZDA (12. apr. 2010) <http://www.advancedfertility.com/embryos.htm>(15. jun. 2010)
- Pittenger M. F., Alastair A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 5411: 143-147
- Radisky D. C. 2005. Epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science*, 118, 19: 4325-4326
- Reubinoff B. E., Pera M. F., Fong C. Y., Trounson A., Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocyst: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology*, 18, 4: 399-404
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguair D., Koodie L., Verfaillie C. M. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98, 9: 2615-2625
- Riazi A. M., Kwon S. Y., Stanford W. L. 2009. Stem cell sources for regenerative medicine. V: Stem cell and regenerative medicine, Methods and protocols,

- volumen 482. Audet J., Stanford W. L. (ur.). Humana Press, a part of Springer Science + Business Media: 55-89
- Richards, M., Fong, C. Y., Chan, W. K., Wong, P. C., Bongso, A. 2002. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 20, 9: 933-936
- Rodan G. A., Rodan S. B. 1988. Expression of the osteoblast phenotype. V: *Bone and Mineral*. Peck W. A. (ur.). Amsterdam, Elsevier: 244-285
- Rožman P., Jež M. 2010. Matična celica in napredno zdravljenje (napredno zdravljenje s celicami, genska terapija in tkivno inženirstvo) – Slovar. Ljubljana, DCTIS – Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije (15. maj 2010).
<http://www.dctis.org/terminoloski.php> (15. jun. 2010)
- Rožman P., Strbad M., Knežević M. 2007. Uporaba matičnih celic v medicini. V: *Genialna prihodnost – genetika, determinizem in svoboda. Mednarodni posvet Biološka znanost in družba*, Ljubljana, 4-5. okt. 2007, Ljubljana. Strgulc-Krajšek S., Popit T., Vičar M., Schrader Š. (ur.). Ljubljana, Zavod RS za šolstvo: 202-212
- Sottile V., Thomson A., McWhir J. 2003. *In vitro*osteogenic differentiation of human ES cells. *Cloning and Stem Cells*, 5, 2: 149-155
- Sudo K., Kanno M., Miharada K., Ogawa S., Hiroyama T., Saijo K., Nakamura Y. 2007. Mesenchymal progenitors able to differentiate into osteogenic, chondrogenic and/or adipogenic cells in vitro are present in most primary fibroblast-like cell populations. *Stem Cells*, 25, 7: 1610-1617
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 4: 663-676
- The International Stem Cell Initiative, Adewumi O., Aflatoonian B., Ahrlund-Richter L., Amit M., Andrews P. W., Beighton G., Bello P. A., Benvenisty N., Berry L. S., Bevan S., Blum B., Brooking J., Chen K. G., Choo A. B., Churchill G. A., Corbel M., Damjanov I., Draper J. S., Dvorak P., Emanuelsson K., Fleck R. A., Ford A., Gertow K., Gertsenstein M., Gokhale P. J., Hamilton R. S., Hampl A., Healy L. E., Hovatta O., Hyllner J., Imreh M. P., Itskovitz-Eldor J., Jackson J., Johnson J. L., Jones M., Kee K., King B.L., Knowles B. B., Lako M., Lebrin F., Mallon B. S., Manning D., Mayshar Y., McKay R. D., Michalska A. E., Mikkola M., Mileikovsky M., Minger S. L., Moore H. D., Mummery C. L., Nagy A., Nakatsuji N., O'Brien C. M., Oh S. K., Olsson C., Otonkoski T., Park K. Y., Passier R., Patel H., Patel M., Pedersen R., Pera M. F., Piekarczyk M. S., Pera R. A., Reubinoff B. E., Robins A. J., Rossant J., Rugg-Gunn P., Schulz T. C., Semb H., Sherrer E. S., Siemen H., Stacey G. N., Stojkovic M., Suemori H., Szatkiewicz J., Turetsky T., Tuuri T., van den Brink S., Vintersten K., Vuoristo S., Ward D., Weaver T. A., Young L. A., Zhang W. 2007. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Science*, 25, 7: 803-816

- Thiede M. A., Smock S. L., Peterson D. N., Grasser W. A., Thompson D. D., Nishimoto S. K. 1994. Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrow megakaryocytes and peripheral blood platelets. *Endocrinology*, 135, 3: 929-937
- Thomson, J. A. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocyst. *Science*, 282, 5391: 1145-1147
- Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B. M. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79, 7: 1147-1156
- Trivedi P., Hematti P. 2008. Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. *Experimental Hematology*, 36, 3: 350-359
- Ungrin M. D., Joshi C., Nica A., Bauwens C., Zandstra P. W. 2008) Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. *PloS One*, 3, 2: 1-11
- User Bulletin #2. ABI PRISM 7700 Sequence detection system. Relative quantification of gene expression. 2001. Applied Biosystems (10. 10. 2001).
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/general/documents/cms_040980.pdf (6. 7. 2010)
- Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7, 2: 211-228
- Zuscik M. J., Matthew J. H., Zhang X., Chen D., Regis J. O. 2008. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *The Journal of Clinical Investigation*, 118, 2: 429-438
- Xiong C., Xie C.-Q., Zhang L., Zhang J., Xu K., Fu M., Thompson W. E., Yang L.-J., Chen Y. E. 2005. Derivation of adipocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, 14, 6: 671-675
- Xu C., Jiang J., Sottile V., McWhir J., Lebkowski J., Carpenter M. K. 2004. Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth. *Stem Cells*, 22, 6: 972-980
- Yamada T., Yoshikawa M., Kanda S., Kato Y., Nakajima Y., Ishizaka S., Tsunoda Y. 2002. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells*, 20, 2: 146-154
- Yamaguchi T. P., Takada S., Yoshikawa Y., Wu N., McMahon A. P. 1999. *T* (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes & Development*, 13: 3185-3190

Young H. E., Steele T. A., Bray R. A., Hudson J., Floyd J. A., Hawkins K., Thomas K., Austin T., Edwards C., Cuzzourt J., Duenzl M., Lucas P. A., Black A. C. 2001. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult and geriatric donors. *The Anatomical Record*, 264, 1: 51-62

WA09 (H13). Madison, Wisconsin, ZDA, WiCell™ Research Institute.
http://www.wicell.org/index.php?option=com_content&task=view&id=260&Itemid=0 (5. 7. 2010)

Watanabe K., Ueno M., Kamiya D., Nishiyama A., Matsumura M., Wataya T., Takahashi J. B., Nishikawa S., Nishikawa S., Muguruma K., Sasai Y. 2007. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 6: 681-686

Wetterwald A., Hofstetter W., Cecchini M. G., Lanske B., Wagner C., Fleisch H., Atkinson M. 1996. Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone*, 18, 2: 125-132

Wiles P. S., Johansson B. M. 1999. Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Experimental Cell Research*, 247, 1: 241-248

7.2 DRUGI VIRI

Hoffman S., Kaplan D., Vunjak-Novakovic G., Meinel L. 2006. Tissue engineering of bone. V: Culture of cells for tissue engineering. Vunjak-Novakovic G., Freshney R. I. (ur.). Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.: 323-374

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Miomirju Kneževiću, ker me je s svojimi predavanji navdušil za delo z matičnimi celicami, mi odprl možnost študijskega obiska na Columbia University v New Yorku ter se resnično zavzel zame.

Posebna zahvala somentorici dr. Darji Marolt za odlično mentorstvo, neposredno pomoč pri delu in vodenje ves čas nastanka tega dela. Menim, da sem se od nje resnično veliko naučila in sem ji hvaležna za ves njen čas, ki ga je vložila vame.

Zahvala prof. dr. Gordani Vunjak-Novaković, vodji Laboratorija za matične celice in tkivno inženirstvo na Univerzi Columbia, da me je prijazno sprejela v svoj laboratorij ter poskrbela, da sem se v njem dobro počutila.

Zahvala recenzentu izr. prof. dr. Marku Kreftu za strokovnen pregled naloge.

Zahvala podjetju Bia d.o.o. ter Roku Štravsu za štipendirjanje študijskega obiska na Univerzi Columbia v New Yorku.

Zahvaljujem se tudi Javnemu skladu Republike Slovenije za razvoj kadrov in štipendije za dodelitev finančnih sredstev za študijski obisk.

Zahvaljujem se dr. Ivánu Marcosu Camposu za pomoč pri oblikovanju nosilcev ter nasaditvi celic na nosilce.

Hvala vsem zaposlenim ter študentom v laboratoriju za prijazne strokovne nasvete ter prijetno družbo v laboratoriju in zunaj njega.

Hvala Davidu A. Lewis in Ellen Winner za prijazen sprejem, gostoljublje in pomoč pri orientaciji v New Yorku.

Hvala Mojci Jež iz Zavoda za Transfuzijsko medicino RS za uvajanje pri delu s celičnimi kulturami ter zalaganje z literaturo. Hvala tudi Urški Tajnšek za nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Hvala prijateljem za vzpodbujanje v času pisanja diplomskega dela.

Hvala vsem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku tega dela.

Velika zahvala staršem za moralno in finančno podporo mojega odhoda v New York. Zahvala tudi fantu Marku za nesebično razumevanje in podpiranje mojih odločitev. Brez vas mi ne bi uspelo, zato to delo posvečam vam.