

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Klara LESJAK

**GOJENJE CELIC ELASTIČNEGA HRUSTANCA ZA UPORABO V
TKIVNEM INŽENIRSTVU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CULTIVATION OF ELASTIC CARTILAGE CELLS FOR USE IN
TISSUE ENGINEERING**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključno delo Univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za celične kulture Zavoda RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani in podjetju Educell d.o.o.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Nino Gunde-Cimerman, za somentorico dr. Elviro Maličev, za recenzenta prof. dr. Borisa Buloga ter za predsednico prof. dr. Jasno Štrus.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Jasna ŠTRUS
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: dr. Elvira MALIČEV
Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Član: prof. dr. Boris BULOG
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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.

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Klara LESJAK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 576.35 : 612.015.3 (043.2) = 163.6
KG	tkivno inženirstvo/elastični hrustanec/hondrociti/izolacija celic/celična kultura/enosloj/alginat/fenotip/elastin/RT-PCR/hemocitometer
AV	LESJAK, Klara
SA	GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentorica)/ MALIČEV, Elvira (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2009
IN	GOJENJE CELIC ELASTIČNEGA HRUSTANCA ZA UPORABO V TKIVNEM INŽENIRSTVU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 63 str., 22 sl., 6 pril., 108 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AL	V diplomski nalogi smo želeli skrajšati in optimizirati postopek izolacije celic elastičnega hrustanca, pridobljenega iz človeškega uhlja. Hrustanec biopsijskih vzorcev treh darovalcev smo namestili v različne encimske medije (0,1 %, 0,3 %, 0,5 % kolagenaza II ter mešanica 0,5 % kolagenaze II in 0,5 % tripsina) in tkivo inkubirali med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem. Po 3., 6. in 21. urah razgradnje smo s pomočjo štetja celic s tripanskim modrilom določili število in odstotek živih izoliranih celic. Število izoliranih celic se je v večini primerov povečevalo v odvisnosti od časa razgradnje in koncentracije kolagenaze II v encimskem mediju. Med vzorci inkubiranimi med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem ni bilo statistično signifikantnih razlik v številu in deležu živih izoliranih celic. Vpliv časa razgradnje in koncentracije kolagenaze II na delež živih izoliranih celic ni bil opazen. V drugem delu diplomske naloge smo želeli izvedeti, ali je humani elastični hrustanec primeren alternativen vir celic za implantacijo na mesta poškodb hialinega sklepnega hrustanca. Hondrocite smo izolirali iz ušesnih biopsijskih vzorcev petih darovalcev. Po sedem dnevnem gojenju v enosloju in alginatnem hidrogelu smo z metodo RT-PCR določili izražanje izbranih genov, ki kodirajo komponente izvenceličnega matriksa (kol II, kol I, agr, ver in els) ter rezultate primerjali s podatki izražanja omenjenih genov pri <i>in vitro</i> gojenih celicah hialinega sklepnega hrustanca. V vzorcih biopsij je bil nivo ekspresije najvišji za gena kol I in els, pričakovano pa je prišlo po gojenju v enosloju do znižanja ekspresije gena za kol II in agr. Nasprotno pri celicah znotraj alginatnega hidrogela ni prišlo do omenjenega znižanja ekspresije. Prav tako je bil nivo ekspresije za gene kol I, kol II, agr in ver primerljiv s podatki za hialini hrustanec, z izjemo gena za els, katerega ekspresija je bila pri celicah elastičnega hrustanca v vseh primerih višja. Na podlagi rezultatov lahko potrdimo, da imajo celice elastičnega hrustanca po kratkotrajnem gojenju v tridimenzionalni kulturi potencial za popravilo poškodb hialinega sklepnega hrustanca.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 576.35:612.015.3(043.2)=163.6
CX tissue engineering/elastic cartilage/chondrocytes/cell isolation/cell culture/
monolayer/alginate/phenotype/elastin/RT-PCR/hemocytometer
AU LESJAK, Klara
AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor)/ MALIČEV, Elvira (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
PY 2009
TI CULTIVATION OF ELASTIC CARTILAGE CELLS FOR USE IN TISSUE
ENGINEERING
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 63 p., 22 fig., 6 ann., 108 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The purpose of this thesis was to shorten and optimize the process of cell isolation from human ear elastic cartilage. Cartilage from the biopsy specimens of three cadaveric donors was placed in a different digestion suspensions (0,1 %, 0,3 %, 0,5 % collagenase II and mixture of 0,5 % collagenase II and 0,5 % trypsin) and incubated under different conditions (stagnation, rotation and mixing). After 3, 6 and 21 hours of digestion the number and percentage of viable isolated cells was determined by trypan blue cell counting. In most cases the number of isolated cells increased with time of digestion and with concentration of collagenase II in digestion suspension. There were no statistically significant differences in the number and percentage of the viable isolated cells between samples incubated under different conditions (stagnation, rotation and mixing). No impact of digestion time and concentration of collagenase II on the percentage of viable isolated cells has been observed either. The second purpose of this graduation thesis was to determine if auricular cartilage is an adequate alternative cell source for implantation into articular surface lesions. Chondrocytes were isolated from a ear biopsy tissue of five cadaveric donors. The expression of specific extracellular matrix genes (col II, col I, agr, ver in els) was analyzed after one week of chondrocytes cultivation in the monolayer and in the alginate hydrogel with the RT-PCR method. Our results were compared with information about gene expression in *in vitro* cultivated articular cells. The cartilage biopsy specimens revealed the highest expression of gen col I and els, and as expected the downregulation of col II and agr expression was observed in the monolayer cultivated cells. On the contrary the mentioned downregulation was not observed in the cells embedded in the alginate hydrogel. Additionally, the expression of genes col I, col II, agr and ver was comparable to articular cartilage. The gene els however, remained higher in the elastic cartilage cells regardless of the culture type. Based on our results we can confirm that auricular chondrocytes cultivated in a 3D environment have a potential to repair articular cartilage lesions.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
SLOVARČEK	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN NALOGE	2
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 HRUSTANEC	4
2.1.1 Osnovne značilnosti	4
2.1.2 Hondrociti	5
2.1.3 Izvencelični matriks	7
2.1.3.1 Kolageni	7
2.1.3.2 Elastin	9
2.1.3.3 Proteoglikani	10
2.1.3.4 Glikoproteini	10
2.2 TKIVNO INŽENIRSTVO	11
2.2.1 Odzem celic ali tkivnega vzorca	12
2.2.2 Izolacija celic iz biopsijskega vzorca	12
2.2.3 Gojenje celic v tkivnem inženirstvu	12
2.2.3.1 Enoslojne celične kulture	13
2.2.3.2 Tridimenzionalni nosilci	13
2.2.4 Gojenje celic v bioreaktorjih	14
2.3 TKIVNO INŽENIRSTVO HRUSTANČNEGA TKIVA	15
2.3.1 Sposobnost obnove hrustančnega tkiva	15
2.3.2 Poškodbe in zdravljenje s pomočjo tkivnega inženirstva	15
2.3.2.1 Avtologna transplantacija hondrocitov	16
2.3.3 Izzivi in težave pri gojenju hrustančnih celic in vitro	16
2.3.4 Uporaba celičnih kultur elastičnega hrustanca	17
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 POTEK POSKUSOV	19
3.2 ODVZEM HRUSTANČNEGA TKIVA	21

3.3	OSNOVNI POSTOPKI GOJENJA CELIČNIH KULTUR	21
3.3.1	Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema	21
3.3.1.1	Kemikalije	21
3.3.1.2	Droben laboratorijski material	21
3.3.1.3	Laboratorijska oprema	22
3.3.2	Izolacija hondrocitov iz hrustančnega tkiva	23
3.3.3	Gojenje celic v enosloju in v alginatnem hidrogelu	24
3.3.4	Dohranjevanje celičnih kultur hondrocitov	25
3.3.5	Tripsinizacija celičnih kultur	25
3.3.6	Štetje celic in določanje odstotka živih celic s tripanskim modrilom	26
3.3.7	Shranjevanje celic v tekočem dušiku	27
3.3.7.1	Postopek zamrzovanja celic	27
3.3.7.2	Postopek odmrzovanja celic	27
3.3.8	Fotografiranje celic pod invertnim mikroskopom	27
3.4	KVANTITATIVNO DOLOČANJE IZRAŽANJA SPECIFIČNIH GENOV V VZORCIH ENOSLOJNIH IN TRIDIMENZIONALNIH KULTUR	28
3.4.1	Izolacija RNA	28
3.4.1.1	Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema	28
3.4.1.1.1	Kemikalije	28
3.4.1.1.2	Potrošni material	28
3.4.1.1.3	Laboratorijska oprema	28
3.4.1.2	Odvzem vzorcev in priprava celic za RNA analize	28
3.4.1.3	Priprava reagentov potrebnih za izolacijo RNA	29
3.4.1.4	Postopek izolacije RNA	29
3.4.2	Prepis RNA v DNA (obratna transkripcija)	30
3.4.2.1	Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema	30
3.4.2.1.1	Kemikalije	30
3.4.2.1.2	Potrošni material	30
3.4.2.1.3	Laboratorijska oprema	30
3.4.2.2	Postopek prepisa RNA v cDNA	30
3.4.3	Analiza izražanja genov z verižno reakcijo pomnoževanja v realnem času	31
3.4.3.1	Način delovanja metode RT-PCR	31
3.4.3.2	Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema	32
3.4.3.2.1	Kemikalije	32
3.4.3.2.2	Potrošni material	33
3.4.3.2.3	Laboratorijska oprema	33
3.4.3.3	Verižna reakcija pomnoževanja v realnem času	33
3.5	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	35
4	REZULTATI	36
4.1	ŠTEVILO IZOLIRANIH IN DELEŽ ŽIVIH IZOLIRANIH HONDROCITOV: VPLIV ČASA RAZGRADNJE, RAZLIČNIH ENCIMSKIH MEDIJEV TER INKUBACIJE MED MIROVANJEM, VRTENJEM IN MEŠANJEM	36
4.1.1	Število izoliranih hondrocitov	36
4.1.2	Delež živih izoliranih hondrocitov	40

4.2	OBLIKA HONDROCITOV, GOJENIH V ENOSLOJNI IN TRIDIMENZIONALNI KULTURI (ALGINATU)	43
4.3	IZRAŽANJE GENOV HONDROCITOV, GOJENIH V ENOSLOJNI IN TRIDIMENZIONALNI KULTURI	44
5	RAZPRAVA	49
5.1	ŠTEVILO IZOLIRANIH IN DELEŽ ŽIVIH IZOLIRANIH HONDROCITOV: VPLIV ČASA RAZGRADNJE, RAZLIČNIH ENCIMSKIH MEDIJEV TER INKUBACIJE MED MIROVANJEM, VRTENJEM IN MEŠANJEM	49
5.1.1	Število izoliranih hondrocitov	49
5.1.2	Delež živih izoliranih hondrocitov	52
5.2	FENOTIPSKE LASTNOSTI CELIC ELASTIČNEGA HRUSTANCA, GOJENIH V ENOSLOJNI IN TRIDIMENZIONALNI KULTURI	54
5.3	SKLEPI	58
6	POVZETEK	60
7	VIRI	61

KAZALO SLIK

Slika 1:	Prečni prerez elastičnega hrustanca. a) shematski prikaz (Caceci, 2003), b) histološka rezina (Bergman, 1999)	6
Slika 2:	Shematski prikaz strukture kolagena (Carmichael, 2008).	8
Slika 3:	Shematski prikaz molekule tropokolagena (Godsell, 2000).	8
Slika 4:	Molekule elastina, ki so povezane s prečnimi kovalentnimi vezmi in tvorijo prožen preplet (Janqueira in Cameiro, 2005).	9
Slika 5:	Prikaz polimerizacije in nastanka netopnih elastičnih vlaken.	9
Slika 6:	Prikaz osnovnih postopkov pri gojenju celic na tridimenzionalnih nosilcih (van Griensven in Kasper, 2004).	15
Slika 7:	Shematski prikaz poteka dela: vpliv časa razgradnje, različnih encimskih medijev ter inkubacije med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem na izolacijo celic elastičnega hrustanca.	19
Slika 8:	Shematski prikaz poteka dela: spremljanje fenotipa celic elastične hrustanca v enoslojni in tridimenzionalni kulturi.	20
Slika 9:	Nosilec iz alginatnega hidrogela.	24
Slika 10:	Prikaz pomnoževanja tarčne cDNK (Taqman® Gene Expression Assays- Protocol, 2004).	32
Slika 11:	Vpliv časa razgradnje in različnih encimskih mešanic na število izoliranih celic pri vzorcih inkubiranih med mirovanju.	38
Slika 12:	Vpliv časa razgradnje in različnih encimskih mešanic na število izoliranih celic pri vzorcih inkubiranih med vrtenjem.	38
Slika 13:	Vpliv časa razgradnje in različnih encimskih mešanic na število izoliranih celic pri vzorcih inkubiranih med mešanjem.	39
Slika 14:	Vpliv časa razgradnje in različnih encimskih mešanic na odstotek živih izoliranih celic pri vzorcih inkubiranih med mirovanjem.	41
Slika 15:	Vpliv časa razgradnje in različnih encimskih mešanic na odstotek živih izoliranih celic pri vzorcih inkubiranih med vrtenjem.	41
Slika 16:	Vpliv časa razgradnje in različnih encimskih mešanic na odstotek živih izoliranih celic pri vzorcih inkubiranih med mešanjem.	42
Slika 17:	Fotografiji primarnih kultur hondrocitov po enotedenskem gojenju v enosloju.	43
Slika 18:	Fotografiji primarnih kultur hondrocitov po enotedenskem gojenju v alginatnem hidrogelu.	43
Slika 19:	Nivo izražanja genov kol II, kol I, agr, ver in els v vzorcih biopsij humanega ušesnega elastičnega hrustanca.	45
Slika 20:	Nivo izražanja genov kol II, kol I, agr, ver in els po 7-dnevnom gojenju celic humanega ušesnega elastičnega hrustanca v enoslojnih kulturah.	45
Slika 21:	Nivo izražanja genov kol II, kol I, agr, ver in els po 7-dnevnom gojenju celic humanega ušesnega elastičnega hrustanca v tridimenzionalnih kulturah.	46
Slika 22:	Diferenciacijski indeksi kol II/kol I, izračunani za vzorce biopsij in celice po sedem dnevnem gojenju v enoslojnih in tridimenzionalnih kulturah.	47
Slika 23:	Diferenciacijski indeksi alg/ver, izračunani za vzorce biopsij in celice po sedem dnevnem gojenju v enoslojnih in tridimenzionalnih kulturah.	47

KAZALO PRILOG

Priloga A	Število izoliranih celic pri posameznih pogojih razgradnje.
Priloga B	Odstotek živih celic pri posameznih pogojih razgradnje.
Priloga C	Rezultati statističnih analiz podatkov števila izoliranih celic pri posameznih pogojih razgradnje – Friedmanov test.
Priloga D	Rezultati statističnih analiz podatkov deleža živih izoliranih celic pri posameznih pogojih razgradnje – Friedmanov test.
Priloga E	Normalizirane vrednosti izražanja izbranih genov v vzorcih petih darovalcev in različnih pogojih gojenja.
Priloga F	Rezultati statističnih analiz podatkov izražanja posameznih genov – Friedmanov in Wilcoxonov test.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

agr	agrekan
cDNK	komplementarna DNK, ki nastane z obratno transkripcijo iz mRNK
kol	kolagen
Ct	mejni cikel pri RT-PCR
dATP	deoksiadenin-trifosfat
dCTP	deoksicitozin-trifosfat
DEPC	dietilpirokarbonat
dGTP	deoksigvanin-trifosfat
D-MEM	Dulbeccova modifikacija Eaglovega medija
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid-trifosfat
dTTP	deoksitimin-trifosfat
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
els	elastin
F12	Hamov medij za celične kulture
FAM TM	6-karboksifluorescin
FBS	fetalni goveji serum
<i>g</i>	enota pospeška pri centrifugiranju
HBSS	Hanksova ozmolarna raztopina soli
min	minuta
mRNK	informacijska ribonukleinska kislina
N	število vzorcev
PBS	slani fosfatni pufer
pov	povprečna vrednost
RNA	ribonukleinska kislina
RT-PCR	verižna reakcija pomnoževanja v realnem času
SD	standardna deviacija ali standardni odklon
TAMRA TM	6-karboksi-tetrametil-rodamin
TR	tripsin
ver	verzikan

SLOVARČEK

agrekan	proteoglikan hrustančnega tkiva
alginat	želatinstva oborina, izvleček rjavih alg s sposobnostjo vsrkati količino vode, ki je do 300-krat večja od lastne teže
bioreaktor	posoda v kateri potekajo biološki in biokemijski procesi pod točno določenimi in nadzorovanimi pogoji gojenja
celična kultura	način gojenja evkariontskih celic zunaj živega organizma
dediferenciacija	proces spreminjanja fenotipa hrustančnih celic v obliko značilno za vezivno tkivo
elastin	protein izvenceličnega matriksa elastičnega hrustanca, ki daje elastičnost in prožnost
enoslojna kultura	nespecifična metoda za gojenje celic, ki temelji na sposobnosti pritrditve celic na dno gojilne posode
fenotip	vidne lastnosti organizma, ki so posledica zapisov v genomu in okoljskih dejavnikov
fibroblast	celica vezivnega tkiva, ki sintetizira amorfn medceličnino (glikozaminoglikane) in vlakna (proelastin in tropokolagen)
fibrocit	celica vezivnega tkiva, ki se razvije iz fibroblasta in vzdržuje medceličnino
glikozaminoglikani	nerazvejani, linearni polimeri, sestavljeni iz ponavljajočih se disaharidnih enot iz aminosladkorja in uronske kisline
hondrocit	osnovna celična enota hrustančnega tkiva
kolagen	pomemben protein izvenceličnega matriksa hrustančnega tkiva, ki daje natezno trdnost in strukturno obliko
kolagenaza	encim, ki katalizira hidrolizo kolagena
mediana	je srednja vrednost nekega zaporedja števil, ki razdeli števila, razvrščena po velikosti, na dve enaki polovici po številu elementov - njena prednost je, da osamelci manj vplivajo na njeno vrednost
mezenhim	embrionalno tkivo, iz katerega se med ostalim razvije tudi hrustančno tkivo
<i>in vitro</i>	procesi in poskusi, ki potekajo v nadzorovanem okolju zunaj živega organizma
tripsin	encim, ki ga uvrščamo med serinske proteaze in katalizira hidrolizo peptidnih vezi
tkivno inženirstvo	interdisciplinarno razvojno-raziskovalno področje, ki združuje najnovejša spoznanja modernih tehnologij ter naravoslovnih in medicinskih znanosti
tridimenzionalna kultura	metoda gojenja evkariontskih celic znotraj različnih nosilcev, ki omogočajo celicam rast v treh dimenzijah prostora
verzikan	poglaviten proteoglikan izvenceličnega matriksa vezivnega tkiva

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Hrustanec, med katerega uvrščamo hialini, vezivni in elastični hrustanec, je oblika vezivnega tkiva, ki sestoji iz manjšega števila hondrocitov in obilnega izvenceličnega matriksa, ki ga sestavljajo različne makromolekule, vključno s kolageni in proteoglikani. Zgradba izvenceličnega matriksa je bistvena za opravljanje zahtevnih nalog hrustanca, saj omogoča, da mehanske obremenitve ne povzročajo deformacije tkiva, pri elastičnem hrustancu pa nudi tudi oporo mehkim tkivom. Zaradi posebne sestave in načina prehranjevanja (samo difuzija) je sposobnost hrustanca, da se sam obnovi po poškodbi ali bolezni zelo slaba. Na mestu poškodbe pride do dediferenciacije in spremembe fenotipa hrustančnega tkiva, kar vodi v izpolnitev poškodovanega dela hrustanca z manjvrednim vezivno - hrustančnim tkivom, ki se veliko slabše zoperstavlja obremenitvam. S pomočjo tkivnega inženirstva, ki razvija biološke nadomestke za okvarjena tkiva in organe, že uspešno zdravimo nekatere poškodbe hrustanca.

Metoda implantacije avtolognih hondrocitov se je izkazala za izredno uspešno pri zdravljenju poškodb sklepnega hrustanca in je dandanes del redne klinične prakse. Strokovnjaki vseskozi strmiyo k izboljšanju in razvoju novih metod, ki bi poenostavile postopek priprave bioloških nadomestkov in skrajšale okrevanje bolnikov. Večina dosedanjih poskusov potrjuje, da je elastični hrustanec obetaven alternativen vir celic za implantacijo na mesta poškodb hialinega hrustanca. Ima določene prednosti pred hialinim hrustancem, saj lahko potrebno biopsijsko tkivo pridobimo z nezahtevnim posegom iz lažje dostopnega mesta (uhelj), kar skrajša okrevanje bolnika. Z omenjenim virom celic bi morda lahko pridobili večje število hondrocitov in tako skrajšali postopek gojenja ali celo omogočili neposredno implantacijo.

Elastično in hialino hrustančno tkivo v telesu opravlja različni funkciji, kar se odraža tudi v različni sestavi izvenceličnega matriksa. Dokazali so, da so hondrociti iz hialinega hrustanca sposobni tvoriti ustrezen izvencelični matriks tudi *in vitro*, če jih gojimo znotraj nekaterih tridimenzionalnih nosilcev. Če želimo kot vir celic za zdravljenje poškodb hialinega hrustanca uporabiti celice elastičnega hrustanca, se moramo pred tem prepričati, da so omenjene celice sposobne proizvajati matriks značilen za hialino hrustančno tkivo. Sami smo predvidevali, da bi se tudi hondrociti iz elastičnega tkiva v ustreznem tridimenzionalnem okolju obnašali podobno kot hondrociti hialinega hrustančnega tkiva, torej predvsem povečali proizvodnjo kol II in agr in zmanjšali proizvodnjo kol I.

V diplomski nalogi smo uporabili vzorce elastičnega hrustanca odvzete iz uhljev darovalcev. Z razgradnjo elastičnega hrustanca pri različnih pogojih smo želeli skrajšati in optimizirati postopek izolacije, saj je pri uporabi hondrocitov v klinične namene čas postopka razgradnje tkiva zelo pomemben, ker želimo izolirane celice čim prej uporabiti. S pomočjo metode RT-PCR in opazovanjem celic pod invertnim mikroskopom smo spremljali fenotipske lastnosti celic elastičnega hrustanca po sedem dnevnem gojenju v enoslojni in tridimenzionalni kulturi ter rezultate primerjali s podatki *in vitro* gojenih celic hialinega hrustanca. Naloga je del obsežnejšega znanstveno-raziskovalnega projekta, v

katerem želimo ugotoviti, kakšen potencial za implantacijo na mesta poškodb hialinega hrustanca imajo celice elastičnega hrustanca. Optimizacija razgradnje in informacije o fenotipskih lastnostih *in vitro* gojenih celic elastičnega hrustanca bi pripomogle k tehnološkemu razvoju tkivno inženirskih aplikacij, katerih osnova so celice elastičnega hrustanca. Slednje se že uporabljajo za zdravljenje vezikoureteralnega refluksa, potekajo pa tudi raziskave transplantacije hondrocitov elastičnega hrustanca na mesto odstranjenega jedra medvretenčne ploščice. Elastični hrustanec je prav tako pogosto uporabljeno tkivo v plastični kirurgiji.

1.2 NAMEN NALOGE

Namen diplomske naloge je bil skrajšati in optimizirati postopek razgradnje humanega elastičnega hrustanca, odvzetega iz uhlja, saj bi lahko v tem primeru hitreje pripravili celično kulturo oziroma izolirane hondrocite že isti dan vstavili na mesto poškodbe. S primerjavo fenotipa celic elastičnega hrustanca po sedem dnevnem gojenju v enoslojni in tridimenzionalni kulturi s fenotipom celic hialinega hrustanca, gojenih pod istimi pogoji, smo želeli določiti, ali je humani elastični hrustanec primeren alternativen vir celic za implantacijo na mesta poškodb hialinega sklepnega hrustanca.

Želeli smo:

1. v čim krajšem času iz biopsijskega vzorca pridobiti zadostno število hondrocitov za nadaljnjo uporabo v klinične namene:
 - spremljati uspešnost razgradnje tkiva v odvisnosti od uporabe različnih encimskih medijev, inkubacije med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem ter časa razgradnje,
 - določiti vpliv različnih encimskih medijev, inkubacije med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem ter časa razgradnje na odstotek živih izoliranih celic,
2. na podlagi kvantitativnega ovrednotenja izbranih genov ugotoviti, če je elastični hrustanec primeren vir celic za popravilo poškodb hialinega sklepnega hrustanca:
 - ugotoviti razlike v izražanju izbranih genov celic elastičnega hrustanca po sedem dnevnem gojenju v enoslojni in tridimenzionalni kulturi (alginatnem hidrogelu) glede na nivo izražanja genov v vzorcih biopsij,
 - fenotip celic elastičnega hrustanca po sedem dnevnem gojenju v enoslojni in tridimenzionalni kulturi primerjati s fenotipom celic hialinega hrustanca, gojenih pod istimi pogoji.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Predpostavili smo, da bi z uporabo ustrezne kombinacije encimske mešanice in mehanske razgradnje lahko skrajšali čas izolacije hondrocitov pri vzorcih odvzetih iz humanega ušesa. Pospešeno razgradnjo hrustančne medceličnine smo pričakovali pri vzorcih, katerih medij za razgradnjo smo mešali z magnetnim mešalom, ter pri vzorcih, ki smo jih v epruvetah z medijem za razgradnjo namestili v steklene valje in jih vrteli v napravi z nastavki za vrtenje. Prav tako smo pričakovali, da bo število izoliranih celic/mg inkubiranega tkiva naraščalo s trajanjem razgradnje in višanjem koncentracije kolagenaze II v mediju za razgradnjo. Sklepali smo, da se bo delež živih celic manjšal z daljšanjem trajanja razgradnje in višanjem koncentracije kolagenaze II ter da bo nižji v encimskem mediju z dodatkom tripsina.

Pričakovali smo, da bodo razlike v izražanju izbranih genov, ki kodirajo komponente izvenceličnega matriksa, v primerjavi z vzorci biopsij najmanjše po gojenju v diskah iz alginata, saj alginatni hidrogel bolje ponazarja naravno tridimenzionalno okolje celic. Pri hondrocitih v enoslojih smo pričakovali pojav spremenjenega izražanja izbranih genov, podoben dediferenciaciji celic hialinega hrustanca, do katerega pride tekom gojenja v enoslojni kulturi. Sklepali smo, da bo fenotip celic elastičnega hrustanca, gojenih v tridimenzionalnih kulturah, najbolj podoben fenotipu celic hialinega hrustanca in da bi bile le-te najprimernejše za implantacijo na mesta poškodb hialinega hrustanca.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HRUSTANEC

2.1.1 Osnovne značilnosti

Hrustanec je specializirana oblika vezivna tkiva, ki se razvije iz mezenhima. Sestavljajo ga specializirane celice imenovane hondrociti ter bogat izvenceličen matriks. Je tkivo, ki je neoživčeno, nima lastnih limfnih žil in kapilar. Prehranjuje se s prehajanjem hranilnih snovi preko izvenceličnega matriksa (Eroschenko in DiFiore, 2007). Njegova osnovna funkcija je zagotavljanje strukturne opore tkivom in preprečevanje njihove deformacije, ki bi jo povzročile mehanske obremenitve (Bucci, 1995). Slednje je mogoče, ker je hrustanec relativno odporen na pritiske in raztezanja (Stockwel, 1979).

Hondrociti so specializirane celice, ki ležijo znotraj posebnih prostorčkov, imenovanih lakune. Število hondrocitov v posamezni lakuni variira od ene do osem celic. Vse celice, ki jih najdemo znotraj posamezne lakune, so potomke ene same celice in tvorijo tako imenovano izogeno skupino hrustančnih celic (Junqueira in Carneiro, 2005).

Glavna naloga hondrocitov je izločanje in vzdrževanje izvenceličnega matriksa, ki sestoji iz netopnih beljakovinskih vlaken, topnih polimerov in vode. Kolagen, hialuronska kislina, proteoglikani in glikoproteini predstavljajo glavne makromolekule, prisotne v matriksu vseh tipov hrustanca (Junqueira in Carneiro, 2005). Izredno pomembne so interakcije med celicami in matriksom, saj regulirajo številne procese kot so: pritrditev, rast, diferenciacija in preživetje celic. Omenjeni procesi so pomembni za razvoj, vzdrževanje in regeneracijo hrustančnega tkiva (Guilak, 1999).

Izvencelični matriks hrustanca lahko razdelimo v tri področja: pericelularni, teritorialni in interteritorialni matriks. Regije matriksa se razlikujejo po oddaljenosti od hondrocitov, vsebnosti proteoglikanov, vsebnosti kolagenskih vlaken, njihovem premeru in orientiranosti (Weinstein in sod. 2005). Pericelularni matriks, ki neposredno obdaja hondrocite, je s proteoglikani najbogatejši del matriksa. Skupaj s hondrociti tvori osnovno enoto hrustanca, imenovano hondron (Mow in Huiskes, 2005). Področje izvenceličnega matriksa, ki obdaja pericelularni matriks, imenujemo teritorialni matriks. Zanj je značilna nižja koncentracija proteoglikanov in vsebnost tanjših kolagenskih vlaken, ki tvorijo košari podobno mrežo okoli posamezne ali skupine hondrocitov (Adolphe, 1992). Najobširnejši in od hondrocitov najbolj oddaljeni je interteritorialni matriks, ki prispeva največji delež k biomehanskim lastnostim hrustanca (Callaghan, 2003). Omenjeni matriks vsebuje najnižjo vsebnost proteoglikanov in kolagenska vlakna, ki so od vlaken v teritorialnem matriksu razlikujejo po debelejšem premeru in drugačni orientiranosti (Weinstein in sod., 2005).

Glede na prisotnost, količino in vrsto beljakovinskih vlaken v izvenceličnem matriksu ločimo tri tipe hrustančnega tkiva: hialini, vezivni in elastični hrustanec. Vsak tip ima specifične lastnosti, ki so povezane z nalogami, ki jih opravljajo. Najpogostejši je hialini

hrustanec, ki ga najdemo v sklepih, rebrnih hrustancih, embrionalnih kosteh, delu nosnega pretina, sapniku in grlu (van Blitterswijk in sod., 2008). Vezivni hrustanec je tip hrustanca, ki se nahaja na mestih, ki potrebujejo čvrsto oporo ali veliko natezno trdnost. Nahaja se v medvretenčnih ploščicah, kolenskem meniskusu in sramni zrasti (Hunziker, 1992). Elastični hrustanec (slika 1), ki je zaradi mreže elastičnih vlaken prožen, najdemo v uhlju, zunanjem sluhovodu in epiglotisu (Bucci, 1995).

Hrustanec se razvije iz mezenhimskih celic, ki se počasi preoblikujejo in odebelijo ter s hitrimi mitotičnimi delitvami tvorijo gosto celično zasnovo hrustanca. Odebeljene celice, ki začno izločati hrustančni matriks, imenujemo hondroblasti. Ko izločeni izvencelični matriks povsem obda celice, tako da so le-te povsem ločene, govorimo o zrelih hrustančnih celicah ali hondrocitih (Kaur, 2001). Med razvojem poteka diferenciacija hrustanca iz centra navzven, kar pomeni, da imajo osrednje celice že lastnosti hondrocitov, medtem ko so celice na periferiji še vedno tipični hondroblasti (Junqueira in Carneiro, 2005).

Mezenhimske celice se diferencirajo tudi v fibroblaste, ki tvorijo perihondrij. To je ovojnica iz gostega vezivnega tkiva, ki obdaja večino hrustanca. Sestavljata jo dve plasti: zunanja plast, ki je dobro oživčena in prekrvljena, ter notranja zarodna plast (Eroschenko in DiFiore, 2007). Fibroblasti notranje plasti imajo sposobnost, da se preobrazijo v hondroblaste, ki se postopoma diferencirajo v hondrocite (Kaur, 2001). Hrustanec se prehranjuje z difuzijo nutrientov iz kapilar v perihondriju, zato ima zunanja plast perihondrija pomembno prehranjevalno funkcijo (Junqueira in Carneiro, 2005).

Hrustanec raste na dva načina: z intersticialno in apozicijsko rastjo. Pri intersticialni rasti raste hrustanec z mitotičnimi delitvami obstoječih hondrocitov, prisotnih znotraj hrustančnega matriksa, in z izločanjem novega matriksa, ki se nalaga med in okrog celic (Eroschenko in DiFiore, 2007). To oblika rasti je značilna predvsem za zgodnje faze razvoja hrustanca in jo tako najdemo pri mladih hrustancih z malo medceličnine. Apozicijska rast se odvija na periferiji hrustanca, kjer se celice z zunanje zarodne plasti perihondrija diferencirajo v hondroblaste, ki se delijo in kasneje, ko se obdajo s hrustančnim matriksom, preoblikujejo v hondrocite (Junqueira in Carneiro, 2005).

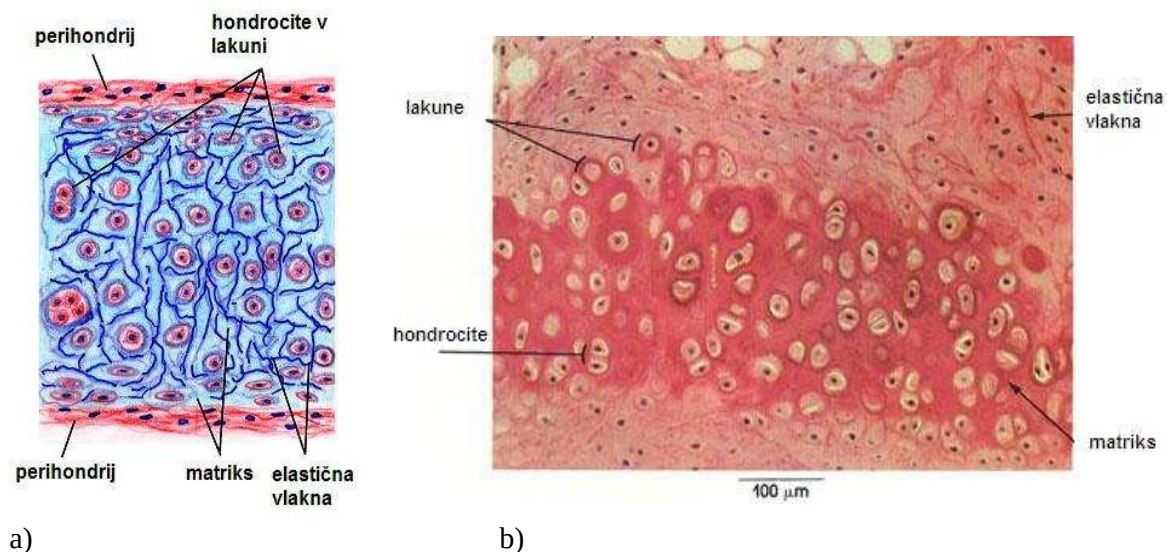
2.1.2 Hondrociti

Mišljenje, da je hrustanec preprosto in homogeno tkivo, je zmotno, saj je v resnici precej variabilno, kar velja tudi za hondrocite. V različnih delih tkiva najdemo hrustančne celice različnih oblik in velikosti, ki so različno razporejene (Stockwel, 1979). Na periferiji hrustanca najdemo hondrocite eliptičnih oblik, medtem ko so celice, ki ležijo globlje, okrogle in se običajno v lakunah pojavljajo v izogenih skupinah do 8 celic (Kaur, 2001). Hondrociti tvorijo izvencelični matriks, vendar se regionalno razlikujejo po stopnji sinteze in tipu sekrecijskih produktov. Tudi površina hondrocitov je precej variabilna. Mnogi celični izrastki segajo v okoliški matriks, medtem ko imajo hondrociti na meji tkiva skorajda gladko površino. Različni tipi hrustanca in celo regije znotraj istega tipa lahko kažejo veliko variabilnost v številu hondrocitov, saj hrustančne celice zasedajo 1-10 % volumna tkiva (Stockwel, 1979). Tako variira število hondrocitov v različnih delih od okoli 7000 do 24000 celic na mm³ (van Blitterswijk in sod., 2008). Povzamemo lahko, da na

obliko, velikost in ostale značilnosti hondrocitov vplivajo tip hrustančnega tkiva, njihova pozicija znotraj tkiva, celična gostota in sama starost organizma.

Kot pri drugih sekrecijskih celicah sta tudi pri hondrocitih najbolj izrazita celična organela zrnati endoplazemski retikulum in Golgijev aparat, kar je posledica produkcije makromolekul. Mladi hondrociti vsebujejo mitohondrije z dobro izoblikovanimi in številnimi kristami, medtem ko pri starejših opazimo slabši razvoj omenjenih organelov, kar kaže na nižjo respiratorno aktivnost pri starajočem hrustancu. Pogosta je tudi prisotnost maščobnih kapljic v citosolu, ki pa lahko variira v odvisnosti od tipa hrustanca, njegove starosti in pozicije hondrocita znotraj tkiva. V celicah elastičnega hrustanca so lipidne kapljice običajno prisotne v velikem številu, kar pa ne pripisujejo funkciji zaloge energije, ampak naj bi imele v celici mehansko funkcijo (Stockwel, 1979). Hrustančne celice vsebujejo v citoplazmi številne filamente, ki imajo pomembno vlogo pri njihovi vezavi z izvenceličnim matriksom in hkrati prispevajo k biomehanskim lastnostim hondrocitov (Van Blitterswijk in sod.).

Hondrociti se z receptorji na celični površini, kot so integrini, aneksin V in CD44, povezujejo z izvenceličnim matriksom. Preko teh interakcij lahko hondrociti zaznajo spremembe v matriksu, ki so posledica deformacije ob mehanskih obremenitvah ali posledica razgradnje molekul matriksa. Hrustanec je živo, metabolno aktivno tkivo, vendar imajo hondrociti omejene zmožnosti prilagajanja spremenjenim razmeram. Metabolna aktivnost hrustančnih celic je relativno nizka, kar omejuje zmožnost hrustanca, da popravi nastale poškodbe (Mow in Huiskes, 2005).



Slika 1: Prečni prerez elastičnega hrustanca. V obilnem izvenceličnem matriksu s kolagenskimi in elastičnimi vlakni se znotraj lakun nahajajo hondrociti. a) shematski prikaz (Caceci, 2003), b) histološka rezina (Bergman, 1999)

2.1.3 Izvencelični matriks

Izvencelični matriks, ki sestoji iz vode, netopnih proteinskih vlaken in topnih polimerov, predstavlja prevladujočo sestavino hrustanca. Od netopnih proteinskih vlaken najdemo v matriksu elastičnega hrustanca elastin in kolagen in le-ta tvorijo ogrodje, ki daje hrustancu trdnost, vzdržljivost, prožnost ter obliko. Od topnih polimerov najdemo v matriksu tri družine makromolekul: glikozamonoglikane, glikoproteine in proteoglikane. (Junqueira in Carneiro, 2005). Proteoglikani z višjo molekulsko maso tvorijo večje agregate, ki so imobilizirani znotraj prostorčkov mreže vlaken. Hondrociti pa izločajo v okolje tudi proteoglikane z nižjo molekulsko maso, ki ne tvorijo agregatov, vendar so prav tako povezani z omrežjem iz kolagenskih in elastičnih vlaken. Visoka vsebnost proteoglikanov in njihov polianionski značaj omogočajo vezavo velike količine vode v matriks, ki predstavlja večino celotne mase hrustanca (Boer in sod. 1989).

Obilni izvencelični matriks ščiti hondrocite ter nudi mehansko oporo. Voda v matriksu ima vlogo medija za prehajanje nutrientov, odpadnih produktov, različnih rastnih faktorjev, citokinov, hormonov, plinov, ionov ter nekaterih drugih molekul (Junqueira in Carneiro, 2005). Hondrociti v lakunah ne tvorijo celičnih povezav, so pa izredno pomembne interakcije med hondrociti in matriksom, saj vplivajo na diferenciacijo in rast celic. Pomembno vezavno vlogo ima izvencelični glikoprotein hondronektin, ki povezuje hrustančne celice s kolagenskimi vlakni v matriksu (Eroschenko in DiFiore, 2007).

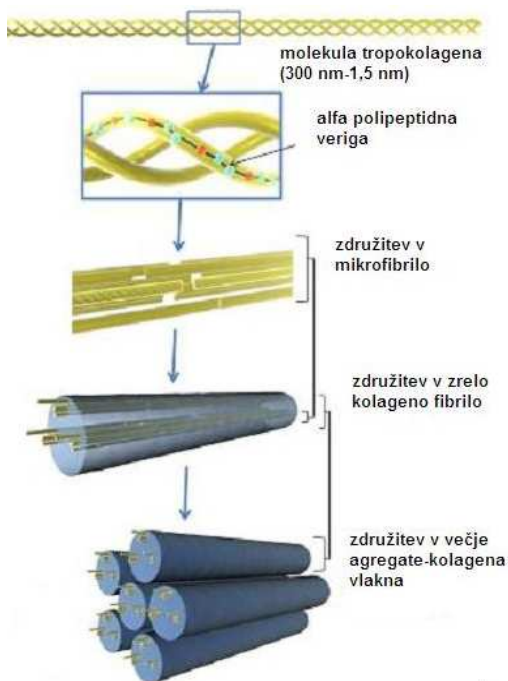
2.1.3.1 Kolageni

Kolageni sestavljajo družino proteinov, za katero je značilna velika heterogenost. Poznamo že veliko različnih kolagenov, ki jih kodira več kot 40 različnih genov. Glede na molekularno sestavo, strukturo, funkcijo in prisotnost v določenem tipu tkiva razdelimo kolagene v različne skupine. Prisotnost posameznih tipov kolagenov v določenem tipu hrustančnega tkiva se odraža v specifičnih fizioloških in mehanskih lastnostih tega tkiva ter v njegovi razporeditvi v telesu (Brinckmann in sod., 2005). V hialinem hrustančnem tkivu prevladuje kolagen II, ki ga v uvrščamo v skupino kolagenov, ki tvorijo dolge fibrile. Omenjena kolagenska vlakna dajejo hialinemu hrustancu natezno trdnost in strukturno obliko. Kolagen tipa I je v matriksu hialinega hrustanca prisoten v majhnih količinah ali pa celo povsem manjka, medtem ko pri elastičnem hrustančnem tkivu slednji tip kolagena prevladuje (Caplan, 1984; Hunziker in sod., 2002).

Kolageni v našem telesu so različnih oblik in velikosti. Gledano z biomehanskega stališča je zelo zanimiva skupina fibrilarnih kolagenov, v katero uvrščamo kolagene tipa II, I, V in XI, ki jih najdemo tudi v hrustancu (Fratzl, 2008). Osnovna enota kolagenskih fibril je tropokolagen, katerega dolžina je okoli 260 nm in premer med 1,4 in 2,0 nm (Williams in Elliott, 1989). Za to molekulo je značilen trojni heliks, sestavljen iz treh α polipeptidnih verig, ki vsebujejo eno ali več za kolagen značilnih regij. Omenjene regije zaznamuje ponavljajoča aminokislinska sekvenca Gly-X-Y, kar omogoča tvorbo trimetrične superhelične molekule. Polipeptidne verige, se ovijejo okoli svoje osi in druga okoli druge, tako da so ostanki glicina skriti v notranjosti vijačnice, ostala aminokislinska ostanka sekvence (X in Y), ki sta pogosto prolin in hidroksiprolin, pa izpostavljena na površju.

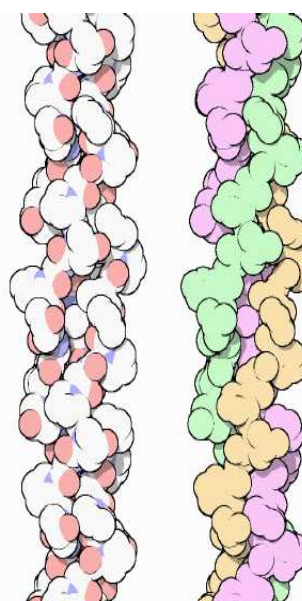
Med seboj so povezane z vodikovimi vezmi in hidrofobnimi interakcijami (Fratzl in sod., 2008). Tropokolagenske molekule, ki so vzporedno ter stopničasto urejene, polimerizirajo v kolagenske mikrofibrile, le-te pa skupaj tvorijo kolagenska vlakna, ki so lahko dolga tudi nekaj mikrometrov (Hancox, 1972).

Sinteza kolagena poteka v več korakih. Prekurzorji α polipeptidnih verig imajo na N-koncu verige posebno signalno aminokislinsko sekvenco, ki omogoča prehod verige z ribosoma v notranjost zrnatega endoplazemskega retikuluma, kjer doživijo serijo posttranslacijskih modifikacij in se povežejo v prokolagenske molekule (Fratzl in sod., 2008). Molekule nato potujejo preko Golgijevega omrežja, kjer se spakirajo v vezikle. Le-ti se zlijejo s celično membrano in molekule se sprostijo v izvencelični prostor. Tu N- in C- prokolagen peptidaza odstrani terminalne propeptide in nastanejo tropokolagenske molekule, ki polimerizirajo v kolagenske mikrofibrile, te pa se povežejo v kolagenska vlakna (Champe, 2007).



Slika 2

Slika 2: Shematski prikaz strukture kolagena. Molekule tropokolagena se združujejo v mikrofibrile, le-te pa naprej v kolagenske fibrile in nazadnje v vlakna (Carmichael, 2008)



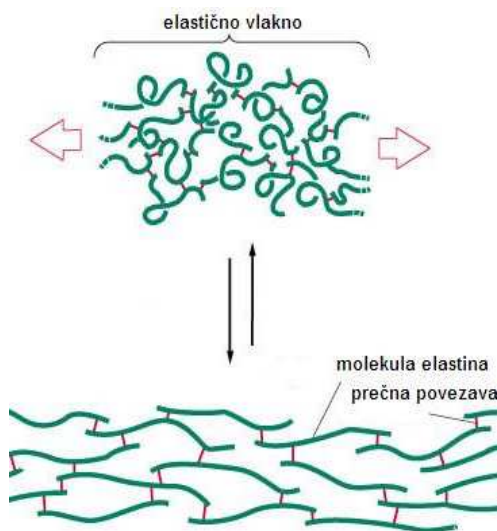
Slika 3

Slika 3: Shematski prikaz molekule tropokolagena, za katero je značilen trojni heliks, sestavljen iz treh α polipeptidnih verig, ki vsebujejo eno ali več za kolagen značilnih regij (Godsell, 2000)

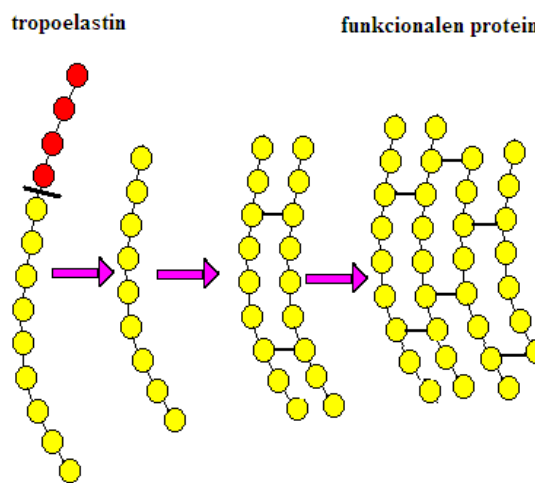
2.1.3.2 Elastin

Poleg kolagena I je pomembna sestavina izvenceličnega matriksa elastičnega hrustanca tudi elastin, ki mu daje elastičnost in prožnost. Nasprotno izvencelični matriks hialinega hrustanca ne vsebuje omenjenih proteinskih vlaken. Osnovna struktura elastina je tako pričakovano drugačna kot pri kolagenu. Ne vsebuje ponavljajoče aminokislinske sekvence Gly-X-Y in ne sestavlja ga trojni heliks. Od aminokislin prevladujejo glicin, alanin, valin, levcin in prolin. V manjši količini je prisoten tudi hidroksiprolin, medtem ko hidroksilizina ni. Zaradi visoke vsebnosti hidrofobnih aminokislin in bogate medsebojne povezanosti je elastin eden izmed najbolj netopnih proteinov (Bezkorovainy in sod., 1996).

Osnovna enota elastina je tropoelastin, ki ga producirajo in v izvencelični matriks izločajo hrustančne celice. Sestavljen je iz okoli 800 – 850 aminokislinskih ostankov in je topen (Bezkorovainy in sod., 1996). V matriksu interagira s specifičnimi glikoproteinskimi mikrofibrilami premera 10 – 12 nm, ki so druga pomembna komponenta elastičnih vlaken (Murray in sod., 2006). Omenjene mikrofibrile, katerih pomembna strukturna komponenta je glikoprotein fibrilin, naj bi imele vlogo ogrođja, ki omogoča pravilno orientiranost in namestitvev molekul tropoelastina, ki nato polimerizirajo (Linke in sod., 2003). Do polimerizacije in nastanka netopnih elastičnih vlaken pride, ko se preko reakcije, ki jo katalizira encim lizil oksidaza, v izvenceličnem matriksom med seboj poveže več molekul tropoelastina. Nastane s številnimi vezmi povezan prožen preplet, ki omogoča, da se elastin tudi po raztezanju vrne v prvotno obliko (Champe in sod., 2007).



Slika 4



Slika 5

Slika 4: Molekule elastina, ki so povezane s prečnimi kovalentnimi vezmi in tvorijo prožen preplet, ki omogoča, da se elastin tudi po raztezanju vrne v prvotno obliko (Janqueira in Cameiro, 2005).

Slika 5: Prikaz polimerizacije in nastanka netopnih elastičnih vlaken do katerega pride, ko se preko reakcije, ki jo katalizira encim lizil oksidaza, v izvenceličnem matriksom med seboj poveže več molekul tropoelastina.

2.1.3.3 Proteoglikani

Proteoglikani vplivajo na prožnost, odpornost na pritisk, raztezanje in nekatere druge fizikalne lastnosti tkiva v katerem se nahajajo. Preko različnih mehanizmov, vključno s pozitivno in negativno regulacijo aktivnosti rastnih faktorjev, vplivajo na aktivnost celic. Količina in narava proteoglikanov prisotnih v tkivu imata vpliv tudi na obliko in organizacijo kolagenskih vlaken (Herndon, 2007).

Proteoglikane označuje prisotnost verig glikozaminoglikanov, ki so kovalentno vezane na osrednjo proteinsko molekulo (Garg in sod., 2002). Glikozaminoglikani so nerazvejani, linearni polimeri, sestavljeni iz ponavljajočih se disaharidnih enot iz aminosladkorja (N-acetilglukozamin ali N-acetilgalaktozamin) in uronske kisline (glukuronska ali iduronska kislina) (King, 2008). Glikozaminoglikani, ki jih najdemo v izvenceličnem matriksu hrustančnega tkiva so: keratan sulfat, hondroitin sulfat in hialuronska kislina. Zaradi hidroksilnih, karboksilnih in sulfatnih stranskih skupin, ki so elektronegativne, so glikozaminoglikani in posledično proteoglikani zelo hidrofilni in tako odgovorni za veliko vsebnost vode v hrustančnem tkivu. Negativno nabite skupine namreč pritegnejo pozitivne ione, kar ima za posledico veliko razliko v koncentraciji ionov znotraj in zunaj hrustanca. Osmotsko neravnovesje ter velikost proteoglikanskih molekul, ki preprečuje njihovo prerazporeditev, imata za posledico vdor vode v hrustančni matriks (Seibel in sod., 2006). Velika vsebnost vode je pomembna za prenos manjših molekul (plinov, hranil, odpadnih produktov, rastnih faktorjev, ionov) ter za odpornost hrustanca na pritisk. Negativni naboji so odgovorni tudi za elektrostatične interakcije s proteinskimi vlakni (Herndon, 2007).

Najpomembnejši proteoglikan hrustančnega matriksa je agrekan. Le-ta tipično sestoji iz okoli sto verig hondroitin sulfata in trideset verig keratan sulfata, ki so vezane na s serinom bogat osrednji protein (Alberts in Wilson, 2008). Molekule agrekana in nekateri drugi proteoglikani se nekovalentno vežejo na hialuronsko kislino, ki za razliko od drugih omenjenih glikozaminoglikanov ne vsebuje sulfatnih skupin. Pri povezavah sodelujejo tudi manjši vezavni proteini, ki ojačajo omenjene vezave s hialuronsko kislino. Posamezna molekula hialuronske kisline lahko veže nekaj sto proteoglikanskih molekul in tako tvori agregate z molekulsko maso 1 do 5×10^8 daltonov in dolžino do nekaj mikrometrov. V hrustančnem tkivu pa najdemo tudi proteoglikane z nižjo molekulsko maso, ki ne tvorijo agregatov (Meisenberg in Simmons, 2006).

2.1.3.4 Glikoproteini

Veliko manjši delež od proteoglikanov predstavljajo glikoproteini, ki so proteini s kovalentno vezanimi oligosaharidi. Za razliko od proteoglikanov, tu protein predstavlja večinski delež molekule. Glikoproteini nastanejo, ko se v posttranslacijskem procesu glikozilacije, ki je encimsko odvisen, sladkorji dodajo na aminokisline asparagin, serin ali treonin. Poznamo dve vrsti glikozilacije: N-glikozilacija (vezava dušika amidne skupine asparagina) in O-glikozilacija (veže se kisik hidroksilne skupine serina in treonina) (Meisenberg in Simmons, 2006).

Hewitt s sodelavci je leta 1980 v hrustančnem tkivu odkril glikoprotein hondronektin z molekulsko maso okoli 180 kilodaltonov. Omenjeni strukturni glikoprotein omogoča

vezavo hondrocit s kolagenom tipa II ter tako poveže hrustančne celice s komponentami izvenceličnega matriksa (Carsons in Horn, 1988).

2.2 TKIVNO INŽENIRSTVO

Tkivno inženirstvo je hitro se razvijajoče in izrazito interdisciplinarno razvojno-raziskovalno področje, ki združuje najnovejša spoznanja modernih tehnologij ter naravoslovnih in medicinskih znanosti. V zadnjih nekaj letih je prišlo do velikega napredka v tkivnem inženirstvu, kar lahko pripišemo številnim novim tehnikam, ki so pripomogle k učinkovitejši izolaciji celic ter uspešnejšemu gojenju in implantaciji produktov celičnega in tkivnega inženirstva. Celice ali *in vitro* izdelana tkiva omogočajo obnovo ali popravilo določenih okvar v tkivih in organih, ki so lahko posledica prirojenih ali pa pridobljenih pomanjkljivosti, in omogočajo vzdrževanje ali pa tudi izboljšanje nekaterih funkcij človeškega tkiva. Strogo nadzorovani pogoji pri gojenju tkivnih in organskih nadomestkov ter stalen nadzor kakovosti dela pogojujejo njihovo uporabo na ljudeh (Saltzman, 2004).

Tkivno in celično inženirstvo predstavlja v razvitem svetu obetajoče in vse pomembnejše področje regenerativne medicine, saj že danes ponuja možnosti za učinkovito zdravljenje oz. obnovo nekaterih poškodovanih ali okvarjenih tkiv (Meyer in sod., 2009). Trenutno se v klinične namene uporabljajo tkivni nadomestki, ki so relativno tanki, neožiljeni, neoživčeni in katerih funkcija je primarno določena z biomehanskimi lastnostmi izvenceličnega matriksa. To so predvsem nadomestki hrustanca, kosti in kože (Ikada, 2006). V Sloveniji se na primer v okviru redne klinične prakse pridobivajo in vsajajo avtologne hrustančne celice, kar pomeni, da z bolnikovimi lastnimi celicami, vzgojenimi v laboratoriju, uspešno zdravijo poškodbe sklepnega hrustanca (Bošnjak, 2007). Vseskozi so v teku tudi številne klinične raziskave, kjer preizkušajo nove tkivno-inženirske postopke, ki obetajo nove načine zdravljenja in zmanjšano uporabo telesu tujih materialov, ki se uporabljajo pri klasičnih oblikah zdravljenja. V prihodnosti bo s pomočjo tkivnega inženirstva morda možno *in vitro* izdelati celoten avtologen organ, s čimer bi rešili probleme kot so: pomanjkanje donorjev organov, zavračanje presajenih organov in nevarnost prenosa različnih nevarnih bolezni (Meyer in sod., 2009).

Kljub naraščajoči potrebi po tkivnih-inženirskih nadomestkih in izjemnemu razvoju, ki ga je omenjeno področje doživelo v zadnjem desetletju, pa nekateri dejavniki omejujejo njihovo uporabo v redni klinični praksi. Ti dejavniki so: pomanjkanje tkivnih biopsij, spremembe fenotipa gojenih celic, potreba po natančnem poznavanju naravnih mehanizmov in lastnosti tkiv, veliki finančni in časovni vložki pri preverjanju in vrednotenju novih metod, razvoj ustreznih nosilcev (Ikada, 2006), problem perfuzije, preživetja in funkcioniranja tkivnega nadomestka po implantaciji, potreba po zelo širokem znanju, ki mora zajemati različne vidike medicine, celične in molekularne biologije, znanosti in inženirstva, ter številna etična vprašanja, ki se nanašajo predvsem na uporabo embrionalnih matičnih celic (Van Blitterswijk in sod., 2008).

2.2.1 Odzem celic ali tkivnega vzorca

Najbolje je, če za zdravljenje poškodb uporabimo avtologne celice oziroma tkivne konstrukte, za kar potrebujemo celice ali vzorec tkiva pacienta. Omenjeni vzorec ali celice lahko pridobimo s pomočjo različnih metod in postopkov, ki jih izberemo glede na vir celic, vrsto celic in tkiva ter vrsto klinične aplikacije. Glede na omenjeno se izbere tudi najustreznejši način za odvzem tkivnega vzorca, ki je lahko manjši kirurški poseg, endoskopija ali nekatere druge oblike biopsij. V splošni klinični praksi so bioptični vzorci in celice odvzeti zgolj za diagnostične namene (histološki pregled) in se jih ne implantira nazaj v pacienta. Nasprotno pa se v primeru tkivnega inženirstva po končanem postopku gojenja tkivo oziroma celice vnesejo v pacienta, kar zahteva strogo sterilne in nadzorovane pogoje pri odvzemu, hrambi, rokovanju in prenosu vzorca do laboratorija, saj lahko le na ta način zagotovimo pacientu ustrezno varnost (Van Blitterswijk in sod., 2008).

2.2.2 Izolacija celic iz biopsijskega vzorca

Po odvzemu tkivnega vzorca je potrebno celice še izolirati, kar pomeni, da jih ločimo med seboj in od izvenceličnega matriksa. Ločitev celic in matriksa se običajno prične z mehansko razgradnjo. Ustrezno metodo in pripomočke izberemo glede na količino tkiva in tip izvenceličnega matriksa. V primeru maščobnega tkiva zadostuje že vorteksiranje v ustreznem mediju, medtem ko je pri tkivih, kot je hrustanec, potreben razrez s skalpelom na čim manjše koščke (Lu in sod., 2006; Van Blitterswijk in sod., 2008). Te tkivne koščke običajno namestimo v ustrezno encimsko mešanico in tako izoliramo celice, ki jih nato prenesemo na gojišče. Pri nekaterih medceličnih povezavah imajo pomembno vlogo od kalcija odvisne adhezivne molekule kadherini in le-te so občutljive na helatorje kalcijevih ionov, kot je etilendiaminotetraocetna kislina (EDTA). V tem primeru lahko celice izoliramo z vnosom biopsije v pufer, ki vsebuje EDTA. Za večino biopsij pa uporabimo encime kot so različne proteaze, kolagenazo in tripsin, ki sprostijo celice iz njihovega izvenceličnega matriksa. Ti encimi so specifični za proteine v izvenceličnem matriksu posameznega tipa tkiva in posledično se določi tudi najprimernejši čas trajanja razgradnje in koncentracija encimske mešanice (Van Blitterswijk in sod., 2008).

2.2.3 Gojenje celic v tkivnem inženirstvu

Po encimski izolaciji celic iz tkiva je potrebno pred klinično uporabo celice običajno še namnožiti do želenega števila, kar dosežemo z različnimi metodami gojenja. Pri gojenju tkivnih in organskih nadomestkov je izredno pomembno, da se čim bolj približamo naravnemu okolju, zato so znanstveniki v zadnjih letih vložili veliko truda v izboljšanje pogojev gojenja, ki bi bili čim bolj podobni naravnim razmeram v telesu in bi omogočali boljšo ohranitev fenotipa izoliranih celic. Slednjega pa ne moremo doseči, če ne poznamo lastnosti posameznega tkiva in celic, ki ga sestavljajo. Celice v tkivu obstajajo znotraj tridimenzionalnega okolja, kjer so v tesnem stiku z izvenceličnim matriksom, ki ima pomemben vpliv na diferenciacijo, rast in preživetje celic (Guilak, 1999). Raziskovalci preizkušajo različne naravne in sintetične materiale, katerih lastnosti in struktura so

podobne naravnemu izvenceličnemu matriksu, da bi zmanjšali pojav dediferenciacije (van Blitterswijk in sod., 2008).

2.2.3.1 Enoslojne celične kulture

Splošno uporabljena metoda gojenja v celičnem in tkivnem inženirstvu je enoslojna celična kultura. V tem primeru izolirane celice namestimo v gojilne posode, ki morajo biti v sterilnem okolju in v ustrezni atmosferi (zrak v katerem je 5% CO₂). V omenjene posode vnesemo tekoči medij, ki pogosto vsebuje serum, ustrezne rastne faktorje, antibiotike, protiglivične snovi in druge specifične dodatke. Celice lahko preživijo in se razmnožujejo le v mediju, ki ima ustrezen pH in temperaturo (37 °C za sesalske celice). Iz medija celice v kulturi pridobijo hranila, kisik in druge potrebne snovi. Celice tvorijo enosloj, tako da se pritrdijo na dno gojilne posode, kar je za večino celic predpogoj za začetek delitev. Dno gojilne posode lahko prevlečemo še s plastjo sestavin izvenceličnega matriksa, da olajšamo pritrditev celic. Ko celice prerastejo celotno gojilno posodo, govorimo o pojavu konfluentnosti in takšno kulturo je potrebno s pomočjo tripsinizacije prenesti v večjo gojilno posodo s svežim hranilnim medijem, saj pride v nasprotnem primeru do kontaktne inhibicije. Tako nastale celične kulture predstavljajo prvo pasažo oziroma celično generacijo. Število pasaž je razen v primeru trajnih celičnih linij omejeno (van Blitterswijk in sod., 2008).

Prednosti enoslojne celične kulture so, da je ekonomična, relativno nezahtevna in omogoča namnožitev velikega števila celic v relativno kratkem času. Slabost pa, da je pogost pojav dediferenciacije, kjer celice spremenijo svoje fenotipske lastnosti, kar je neugodno za tkivno-inženirske aplikacije, saj celice izgubijo svojo funkcionalnost (van Blitterswijk in sod., 2008).

2.2.3.2 Tridimenzionalni nosilci

Zaradi pojava dediferenciacije v enoslojnih kulturah izolirane celice vse pogosteje nasadijo v tridimenzionalne nosilce, ker je proces do neke mere reverzibilen (Benya in Scaffar, 1982; Frenkel in DiCesare, 1999; Barlič in Maličev, 2008). Gre za naravne ali sintetične polimere v različnih oblikah, ki omogočajo celicam rast v treh dimenzijah prostora (Fedorovich, 2006). Pomembno je, da je nosilec biodegradabilen, porozen in ima ustrezne mehanske in kemijske lastnosti ter sposobnost uravnavanja celične dejavnosti, kot sta npr. razmnoževanje in diferenciacija. Posebej primerni za različne tkivnoinženirske aplikacije in pogosto uporabljeni so hidrogeli, ki vsebujejo, kot pove že ime, veliko količino vode, ki omogoča prenos hranil in odpadnih snovi in daje elastičnost. Za pripravo hidrogelov se uporabljajo različni vodotopni polimeri, ki se preko vodikovih vezi ali ionskih interakcij povežejo in tvorijo vodoodporne mrežaste strukture (Barlič in Maličev, 2008). Tako nastanejo nosilci kot so agarozni gel, alginat, fibrin in hitozan (Swarbrick in Boylan, 2004).

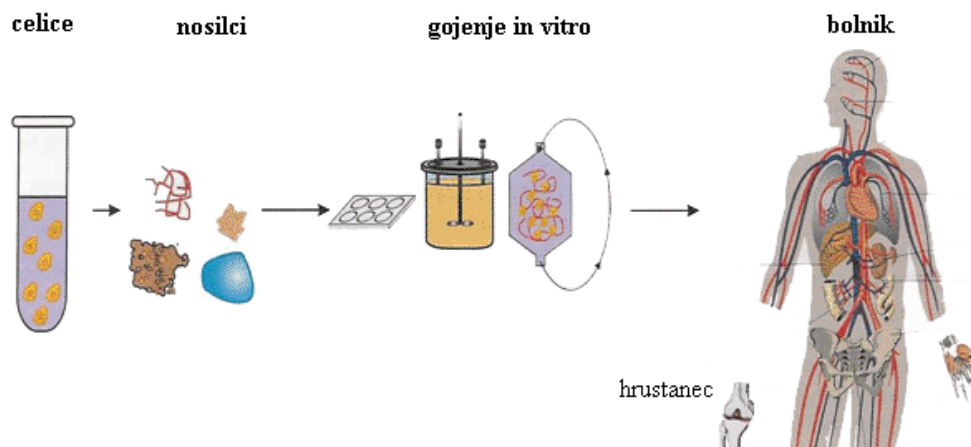
Podobno kot enoslojne kulture ima tudi uporaba tridimenzionalnih nosilcev svoje prednosti in slabosti. Maksimalna debelost tkivnih kultur je omejena s sposobnostjo difuzije nutrientov in kisika do celic ter odpadnih produktov iz nastajajočega tkiva. Ker so

tridimenzionalne kulture z vseh strani obdane z medijem, je mogoča maksimalna debelina večja kot v primeru enoslojnih kultur, vendar je difuzija hranil in kisika v notranjost nosilcev kljub obdajajočemu mediju in porozni strukturi nosilcev velikokrat nezadostna. Celice imajo znotraj tridimenzionalnega okolja veliko možnosti za pritrditev in rast, a je njihova rast počasnejša, kot če bi jih gojili v enoslojni kulturi (Bronzino, 2000). Kot že omenjeno pa je velika prednost pred gojenjem v enosloju, da so spremembe fenotipskih lastnosti celic manjše in da je po nasaditvi celic na ustrezen tridimenzionalni nosilec proces dediferenciacije do določene stopnje reverzibilen (Benya in Scaffer, 1982; Frenkel in DiCesare, 1999; Barlič in Maličev, 2008). Zato se v tkivnem inženirstvu osnovna enoslojna kultura pogosto uporablja predvsem za hitro namnožitev celic, pred implantacijo pa se nasadijo na ustrezne tridimenzionalne nosilce, da se čim bolj povrne prvoten fenotip, s čimer se poveča kakovost celic (Mukaida in sod, 2005). Povrne se prvotna oblika celic in ekspresija genov se približa tisti v tkivu, hkrati pa uporaba nosilcev velikokrat omogoča manj invazivno metodo operacije pri implantaciji nadomestka (Benya in Scaffer, 1982; Barlič in Maličev, 2008).

2.2.4 Gojenje celic v bioreaktorjih

Eden izmed pomembnejših izzivov pri tkivnem inženirstvu je, kako obdržati debelejši in kompleksni tkivni konstrukt viabilen *in vitro* med gojenjem ter *in vivo* po implantaciji. Raziskovalci so v preteklosti preizkusili različne tehnike nasaditve celic (Vunjak-Novakovic in sod., 1998.; van Blitterswijk in sod., 2008), ki omogočajo enakomerno prostorsko nasaditev na nosilce, vendar niso dosegli želenih rezultatov, saj so se zaradi omejitve difuzije znotraj konstrukta še vedno pojavljala heterogena področja, ki jih zaznamuje velika gostota celic na periferiji in manjša v notranjosti konstrukta (Lewis in sod., 2005; Malda in sod., 2004; van Blitterswijk in sod., 2008) ter neenakomerna razporeditev izvenceličnega matriksa (Martin in sod., 1999; van Blitterswijk in sod., 2008). Danes se uporabljajo različne metode, ki naj bi zmanjšale omejitve difuzije in povečale oskrbo celic z nutrienti in kisikom. Ena izmed teh metod je tudi gojenje celic v bioreaktorjih, kjer so pogoji gojenja vseskozi kontrolirani (van Blitterswijk in sod., 2008).

Na splošno je bioreaktor posoda v kateri potekajo biokemijske reakcije. Gledano s stališča tkivnega inženirstva pa je bioreaktor definiran kot pripomoček v katerem potekajo biološki in biokemijski procesi pod točno določenimi in nadzorovanimi pogoji gojenja (Martin in sod., 2004). Bioreaktor naj bi zagotovil optimalno *in vitro* okolje za hitro rast celic in proizvodnjo tkivnih pripravkov. Njegova pomembna naloga je, da izboljša oskrbo celic s hranili in posebej s kisikom, ki je zaradi svoje slabe topnosti in difuzivnosti pogosto omejujoči dejavnik pri gojenju *in vitro* (Casey in Arhur, 2000). Zaradi povišanega prenosa kisika in hranil v notranjost tkivnega konstrukta, povišane koncentracije kisika in enakomernejše razporeditve hranil v gojilnem mediju je razporeditev celic znotraj tkivnega konstrukta veliko bolj homogena, zviša pa se tudi stopnja preživetja celic (van Blitterswijk in sod., 2008).



Slika 6: Prikaz osnovnih postopkov pri gojenju celic na tridimenzionalnih nosilcih, ki so lahko naravni ali sintetični. Prav tako se razlikujejo pogoji gojenja *in vitro* (van Griensven in Kasper, 2004).

2.3 TKIVNO INŽENIRSTVO HRUSTANČNEGA TKIVA

2.3.1 Spособnost obnove hrustančnega tkiva

Čeprav ima naše telo v veliki meri zmožnost obnove, pa najdemo v telesu tudi tkiva, ki kljub metabolični aktivnosti nimajo ali imajo omejeno zmožnost regeneracije (Meyer in Wiesmann, 2006). V slednjo skupino tkiv uvrščamo tudi hrustanec. Vsakršna poškodba tkiva inicira poseben regeneracijski odgovor (Buckwalter, 1997, Meyer in Wiesmann, 2006). Zmožnost hondrocitov, da zaznajo spremembe v sestavi izvenceličnega matriksa in sintezo novih molekul, predstavlja osnovo za popravljalne mehanizme. Omejeno zmožnost regeneracije hrustanca pa lahko pripišemo predvsem dejstvu, da hrustanec ni neposredno prekrvavljen in oživčen, in da vsebuje majhno število nediferenciranih celic (Martin in Buckwalter, 2000). Dodaten omejujoči dejavnik pa so hondrociti, ki so tesno ujete znotraj izvenceličnega matriksa, in tako kljub delitvi težko migrirajo na mesto poškodbe (Wnek in Bowlin, 2004). V nasprotju s hrustancem odraslega človeka pa ima hrustanec zarodka veliko večjo zmožnost regeneracije, kar lahko pripišemo razliki v strukturi in sestavi izvenceličnega matriksa (Namba in sod., 1998).

2.3.2 Poškodbe in zdravljenje s pomočjo tkivnega inženirstva

Zaradi naraščajočega števila poškodb hrustanca, ki nastanejo predvsem kot posledica povečane obremenitve hrustanca med fizičnimi aktivnostmi, boleznimi ali starosti, in zaradi omejene sposobnosti hrustanca, da te poškodbe popravi, so bili raziskovalci in zdravniki prisiljeni iskati nove rešitve in metode, ki bi pripomogle k regeneraciji nastalih poškodb (Van Blitterswijk in sod., 2008). V mnogih primerih niso dosegli želenih rezultatov, saj je prišlo do tvorbe hrustančno-fibroznega tkiva, ki je biomehansko manjvredno in ni odporno

na večje in daljše obremenitve, kar vodi le v kratkotrajno izboljšanje funkcionalnosti in lajšanje simptomov (Buckwalter in Mankin, 1998; Van Blitterswijk in sod., 2008). Leta 1994 je bil objavljen prvi članek z rezultati poskusov celičnega zdravljenja hrustančnih poškodb, pri katerem so uporabili bolniku lastne hrustančne celice (Brittberg, 1994). Metoda implantacije avtolognih hondrocitov se je izkazala za uspešno in je dandanes del redne klinične prakse.

2.3.2.1 Avtologna transplantacija hondrocitov

Pri omenjeni metodi gre za celično zdravljenje, in sicer za vzgojo bolniku lastnih zdravih hrustančnih celic v laboratoriju, ki jih kasneje vstavimo na mesto poškodbe hrustanca (Brittberg, 1994; Barlič in Maličev, 2008). Razvita je bila za zdravljenje poškodb kolenskega hrustanca in se tudi v Sloveniji uporablja kot del redne klinične prakse za zdravljenje omejenih hrustančnih lezij (Radosavljevič, 2006). Bolniku odvzamemo majhen košček zdravega hrustančnega tkiva, v laboratoriju encimsko izoliramo hondrocite iz tkiva in jih namnožimo do želenega števila (Brittberg, 1994; Barlič in Maličev, 2008). V preteklosti so nato celice v obliki suspenzije vbrizgali na mesto poškodbe pod zaplato periosta, danes pa hondrocite vse pogosteje gojimo na nosilcih (tako dvodimenzionalnih kot tridimenzionalnih), saj tako olajšamo tudi operativno tehniko ob implantaciji hondrocitov (Radosavljevič, 2006). Vseskozi potekajo tudi raziskave v smeri posodabljanja tehnologije, iskanja idealnega tridimenzionalnega nosilca in manj invazivnih operativnih tehnik ter novih, učinkovitejših metod izolacije in gojenja hrustančnih celic *in vitro*.

2.3.3 Izzivi in težave pri gojenju hrustančnih celic *in vitro*

Pomemben izziv je pridobitev zadostnega števila hondrocitov za tvorbo tkivnega konstrukta, katerega velikost bi bila primerna za regeneracijo poškodbe hrustanca. Ker je proliferacija hondrocitov v celični kulturi omejena, jih moramo v čim krajšem času namnožiti do želenega števila. Tu se srečamo s problemom dediferenciacije hrustančnih celic, saj se hondrociti po izolaciji in gojenju *in vitro* zelo radi dediferencirajo v fibroblaste, kar pomeni, da postopoma spremenijo svoje fenotipske lastnosti in postanejo na videz podobni fibroblastom (Mayer in sod., 2009). Faktorji, ki lahko vplivajo na zvečanje omenjene dediferenciacije so naslednji: gojenje celic v enosloju, nasaditev neustreznega števila celic v gojišče, izolacija celic iz biopsije hrustanca starejšega človeka in izolacija celic iz hrustančnega sarkoma (Sabatini, 2004).

Enega glavnih pokazateljev za proces dediferenciacije predstavljajo kvantitativne in kvalitativne spremembe v sintezi makromolekul izvenceličnega matriksa. V kulturi pride do padca sinteze značilnih proteinov hrustančnega matriksa in do porasta sinteze nekaterih nespecifičnih proteinov. Hondrociti proizvajajo in izločajo vse manj za hrustanec značilnih proteoglikanov in namesto kolagena II proizvajajo vse več kolagena tipa I (Wong M, Hunziker 1998; van Osch in sod, 2001; Barlič in Maličev, 2008). Opazen je tudi preskok iz produkcije proteoglikanov z visoko molekulsko maso (agrekani) na produkcijo proteoglikanov z nizko molekulsko maso (dekorin in biglikani) (von der Mark in sod., 1977; Benya in Shaffer, 1982; Mitrovic in Darmon, 1990; Buckwalter in Mankin, 1997). Pri elastičnem hrustancu se zmanjša produkcija elastičnih vlaken (Moskalewski, 1979).

Opazna je tudi sprememba okroglaste oblike v podolgovato fibroblastno obliko (von der Mark in sod., 1977). Pojav dediferenciacije poskusimo čim bolj omejiti, saj z zagotavljanjem hrustančnega fenotipa celic, povečamo možnost za tvorbo kakovostnega tkiva na mestu implantacije in klinično uspešnost postopka (Adolphe in sod., 1992).

Poleg dediferenciacije se pri gojenju hrustančnih celic *in vitro* srečujemo še z nekaterimi drugimi težavami in omejitvami. Izolirane humane hrustančne celice imajo omejen proliferacijski potencial in število celičnih delitev *in vitro* se s starostjo manjša (Dozin in sod., 2002), prav tako pa se zmanjša njihova sposobnost rediferenciacije (Benya in Shaffer, 1982). Hondrogenezo lahko pospešimo z ustrezno gosto nasaditvijo hondrocitov (potrebno število hondrocitov na nasilcu je več kot 20×10^6 celic/ml ali vsaj 1×10^6 celic/cm²) (Puelacher in sod., 1994; Iwasa in sod. 2003; van Blitterswijk in sod., 2008), uporabo specifičnih rastnih faktorjev, gojenjem v kulturi peleta (Holtzer in sod., 1960; Bassleer in sod., 1986) in nekaterimi drugimi dejavniki, vendar pa pogoji, ki favorizirajo ohranitev hrustančnega fenotipa, običajno niso skladni s tistimi, ki favorizirajo porast števila celic (Glowacki in sod., 1983). Povzamemo lahko, da je število kakovostnih hrustančnih celic, ki jih lahko vzgojimo *in vitro* in uporabimo za popravilo poškodbe hrustanca, omejeno.

Preden se odločimo za zdravljenje poškodovanega tkiva s pomočjo avtolognih hrustančnih celic, moramo imeti v mislih, da imajo na kakovost izoliranih celic in posledično na uspeh zdravljenja poškodbe pomemben vpliv starost bolnika, stanje hrustanca na mestu odvzema, travma, stopnja poškodbe hrustanca, diabetes in nekatere druge bolezni (Mayer in sod., 2009), zato vsi bolniki niso primerni za omenjeno zdravljenje. Za pridobitev ustrezne biopsije hrustančnega tkiva pacienta in vsaditev pripravljenega celičnega nadomestka je potreben operativni poseg, kjer so možni zapleti in potrebna je rehabilitacija, kar je pomembna omejitev. Znanstveniki se trudijo, da bi bili v prihodnje posegi čim bolj prijazni bolniku in bi lahko operacijo izvršili zgolj v enem koraku.

2.3.4 Uporaba celičnih kultur elastičnega hrustanca

Podobno kot za hialini hrustanec obstajajo številne predklinične in kliničnih raziskave za uporabo *in vitro* vzgojenih celic elastičnega hrustanca, katerih rezultati so zelo spodbudni. Implantacija avtolognih gojenih hondrocitov elastičnega hrustanca se je izkazala kot uspešna metoda za zdravljenje vezikoureteralnega refluksa, pri katerem gre za stekanje seča iz mehurja nazaj v ledvico kot posledica oslabljenega vezikoureteralnega ustja, kar povzroča kronično vnetje in okvaro ledvic (Atala in sod.2003). Dosedanji klinični rezultati so spodbudni, saj kažejo, da lahko s pomočjo endoskopske vstavitve celičnega pripravka odpravimo ali zmanjšamo refluks višjih stopenj (Kmetec in sod., 2005; Kregar Velikonja in sod., 2008).

Bolečine v križu sodijo med najpogostejše vzroke obiskov pri zdravniku v zahodnem svetu. Pogosto je omenjena bolečina posledica degeneracije medvretenčne ploščice, saj zaradi kronične preobremenjenosti hrbtnice prihaja vse pogostejše do njene predčasne obrabe (Poiraudau in sod., 1999). Uspešna in vse pogostejša uporaba metode avtologne transplantacije hondrocitov za zdravljenje nekaterih poškodb hrustanca je dala raziskovalcem zagon za izdelavo biološkega nadomestka za pulpozno jedro medvretenčne ploščice. Izvedenih je bilo že nekaj poskusov na živalih, ki so za izdelavo omenjena

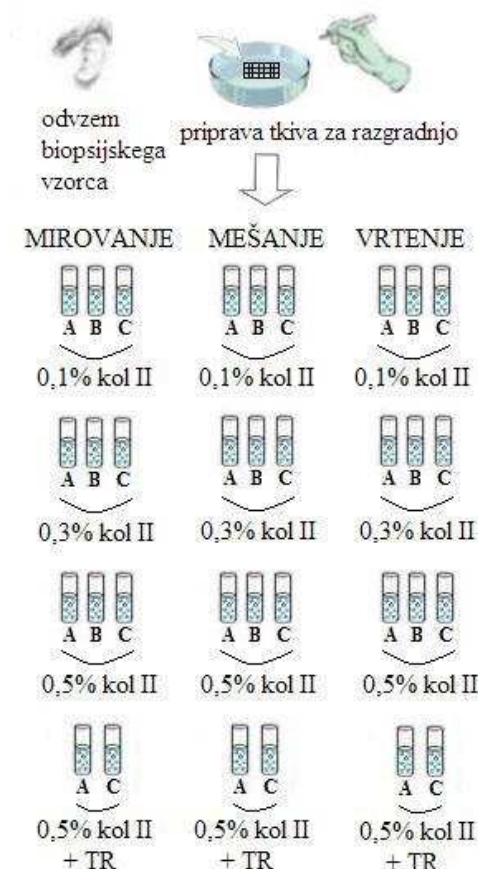
nadomestka uporabili celice ušesnega elastičnega hrustanca. Dobljeni rezultati dokazujejo sposobnost transplantiranih celic elastičnega hrustanca za obnovo mesta, kjer je bilo odstranjeno jedro medvretenčne ploščice (Gorenšek in sod., 2004). Vsekakor pa moramo nadaljevati s poskusi in projekti, da bomo imeli več informacij o učinkovitosti, varnosti, fenotipu in rediferenciaciji celic po implantaciji ter bomo lahko metodo tudi optimizirali (Sakai, 2008).

V teku pa so še raziskave na področju plastične kirurgije in nekaterih drugih kliničnih področjih, katerih vir celic za tkivno inženirske aplikacije so hondrociti ušesnega elastičnega hrustanca, saj imajo nekatere prednosti pred hialinim hrustancem. Pomembnejša prednost elastičnega hrustanca za uporabo v tkivnem inženirstvu je, da lahko potrebno tkivno biopsijo pridobimo z nezahtevnim in kratkotrajnim posegom s hitrejšo rehabilitacijo bolnika (Kregar Velikonja in sod., 2008). Slabost je v tem, da imamo v primerjavi s celicami sklepnega hrustanca le malo dokazov o zmožnostih rediferenciacije in regeneracije *in vitro* gojenih celic elastičnega hrustanca *in vivo*, in da večina le-teh izhaja iz poskusov na živalih (Gorenšek in sod., 2004; Westreich in sod., 2004). Vendar so dosednji rezultati predkliničnih in kliničnih raziskav dovolj obetavni, da nam služijo kot pomemben argument, da nadaljujemo z raziskovanjem rediferencijskih sposobnosti hondrocitov elastičnega hrustanca in z razvojem njihovega potenciala za uporabo v različnih aplikacijah tkivnega inženirstva.

3 MATERIALI IN METODE

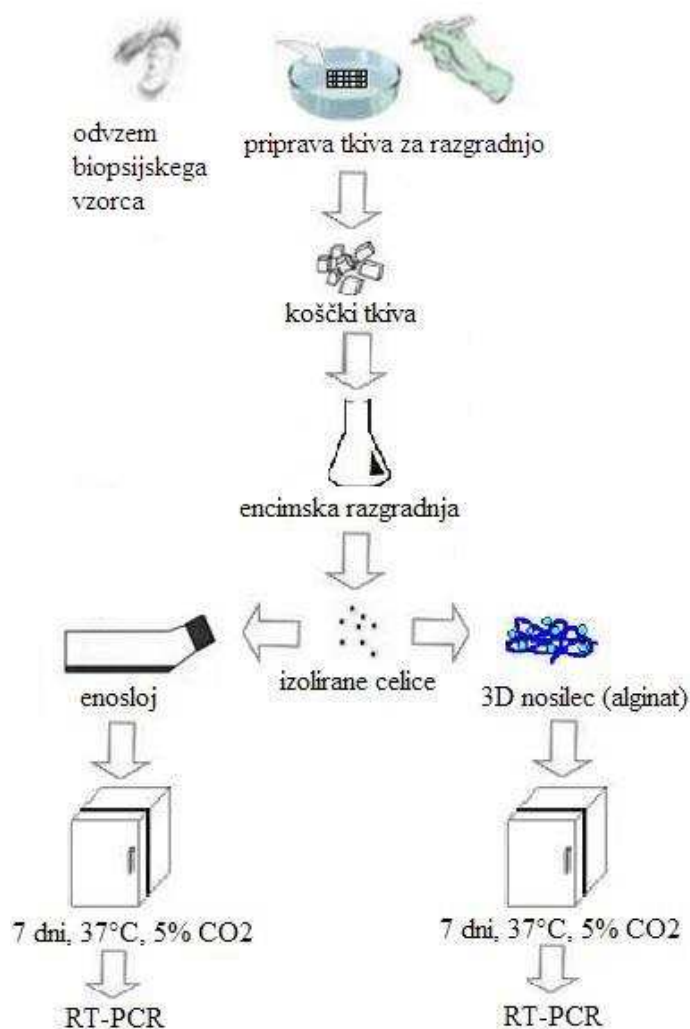
3.1 POTEK POSKUSOV

Kot je prikazano na Sliki 6, smo biopsijske vzorce ušesnega elastičnega hrustanca treh darovalcev, ki so bili različno stari (24, 27 in 40 let) s pomočjo skalpela razrezali na majhne koščke. Predhodno smo pripravili medij za razgradnjo s tremi različnimi koncentracijami encima kolagenaze II (0,1 %, 0,3 % in 0,5 %) ter mešanico 0,5 % kolagenaze II in 0,5 % tripsina. Koščke tkiva smo enakomerno razdelili in jih prenesli v centrifugirke ali čaše (odvisno od pogojev inkubacije) z 10 ml ustrezne encimske mešanice, tako da smo imeli skupaj 9 vzorcev z 0,1 %, 0,3 % in 0,5 % kolagenazo ter 6 vzorcev z mešanico 0,5 % kolagenaze II in 0,5 % tripsina. Vzorce smo nato inkubirali pri različnih pogojih (mirovanje, vrtenje, mešanje). Po 3., 6. in 21. urah razgradnje tkiva v različnih encimskih mešanicah med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem smo prešteli izolirane celice in določili odstotek živih celic s pomočjo hemocitometra in tripanskega modrila. Celice, ki smo jih dobili po izolaciji, smo zamrznili.



Slika 7: Shematski prikaz poteka dela: vpliv časa razgradnje, različnih encimskih medijev ter inkubacije med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem na izolacijo celic elastičnega hrustanca.

V drugem delu diplomske naloge smo uporabili biopsijske vzorce ušesnega elastičnega hrustanca, ki so bili v aseptičnih pogojih odvzeti petim moškim darovalcem (starosti od 32 do 43 let) znotraj 30 ur po njihovi nenadni smrti (Slika 7). Odobritev za izvajanje poskusov, ki so del obsežnejšega raziskovalnega projekta, je izdala Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (številka odobritve 30/09/05). Biopsijske vzorce smo s pomočjo skalpela razrezali na majhne koščke ter jih 18 ur inkubirali v encimskem mediju. Iz izoliranih celic petih darovalcev smo nato paralelno pripravili enoslojne kulture hondrocitov (nasaditvena gostota je bila 3000 celic/cm²) in celice nasadili v alginat, in sicer v koncentraciji 1×10^6 celic/ml. Enoslojne in tridimenzionalne celične kulture smo 7 dni gojili v enakem gojilnem mediju (D-MEM s 15 % humanim serumom in 50 µg/ml gentamicina) v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂. Gojilni medij smo zamenjali dvakrat v tednu.



Slika 8: Shematski prikaz poteka dela: spremljanje fenotipa celic elastičnega hrustanca v enoslojni in tridimenzionalni kulturi.

Po sedmih dneh gojenja v inkubatorju smo iz enoslojnih in tridimenzionalnih kultur (diskov alginata) odvzeli vzorce celic za izolacijo RNA. Iz vzorcev smo s pomočjo Trireagenta (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) izolirali RNA in jo prepisali v cDNA z uporabo High Capacity cDNA Archive kita (Applied Biosystems, Foster City, CA) in cDNA analizirali z metodo RT-PCR. Zanimalo nas je izražanje genov, ki kodirajo gradbene enote, specifične za hialini izvencelični matriks (kolagen II in agrekan) in genov, ki kodirajo gradbene enote, specifične za fibroblastni tip hrustančnega tkiva (kolagen I in verzikan). Poleg tega smo spremljali še izražanje elastina, značilnega za elastični hrustanec. Izražanje genov smo analizirali s programi SDS 2.1 (Applied Biosystems, ZDA) in Microsoft Excel.

3.2 ODVZEM HRUSTANČNEGA TKIVA

Biopsijski vzorci elastičnega hrustanca so bili v aseptičnih pogojih odvzeti in takoj preneseni v transportni lonček s sterilno, na 37 °C ogreto transportno tekočino – D-MEM/F-12 (1:1) (Gibco, ZDA) z antibiotikom gentamicinom (50 µg/ml) (Gibco, ZDA).

3.3 OSNOVNI POSTOPKI GOJENJA CELIČNIH KULTUR

3.3.1 Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema

3.3.1.1 Kemikalije

- D-MEM/F-12 (1:1) (Gibco, Paisley, Velika Britanija)
- DMSO (Sigma, ZDA)
- CaCl₂ (25 mM) (Merck, Nemčija)
- FBS (BioWhittaker, Verviers, Belgija)
- Humani serum (Zavod RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani, Educell d.o.o.)
- Fungizon (250 µg/ml) (Gibco, ZDA)
- Gentamicin (50 µg/ml) (Gibco, ZDA)
- PBS
- HBSS (Gibco, ZDA)
- Alginat (MediAlg MG17, Švica)
- Kolagenaza II (324U/ml) (Gibco, ZDA)
- Tripansko modrilo (Gibco, ZDA)
- Trypsin/EDTA (0,5 g tripsina, 0,2 g EDTA, 0,85 g NaCl/l) (Sigma, ZDA)

3.3.1.2 Droben laboratorijski material

- Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- Celična sita 40 µm (Falcon, ZDA)

- Epruvetke za zamrzovanje (Costar, ZDA)
- Hemocitometer - Neubauerjeva komora (Sigma, ZDA)
- Injekcijske brizge 20 in 50 ml (Tyco Kendall, Združeno kraljevstvo V. B. In S. I.)
- Krovna stekla
- Mikrocentrifugirke 1,5 ml (Costar, ZDA)
- Pinceta
- Pipete za enkratno uporabo 2, 5, 10 in 50 ml (Costar, ZDA)
- Pipetni nastavki 10-100 µl in 100-1000 µl (Costar, ZDA)
- Gojilne plošče s 6 in 24 luknjami (TPP, Švica)
- Polipropilenske centrifugirke 15 in 50 ml (Falcon, ZDA in TPP, Švica)
- Polipropilenske petrijevke 35 mm (TPP, Švica)
- Posode za gojenje celičnih kultur 25 cm² (Costar, ZDA)
- Aluminijska folija
- Steklene čaše
- Skalpel
- Spatula
- Sterilizacijski filter Minisart 0,2 µm (Sartorius, Nemčija)
- Stojalo za centrifugirke in mikrocentrifugirke
- Magneti za magnetno mešalo

3.3.1.3 Laboratorijska oprema

- Analitska tehtnica (Scaltec, Germany)
- Centrifuga (Tehtnica, PLC 322, Slovenija)
- CO₂ inkubator (Jouan IG 150, ZDA)
- Digitalni fotoaparat Nikon E900 (Nikon, Japonska)
- Rotacijski stresalnik, vortex, MS2 Minishaker (IKA, ZDA)
- Hladilnik (+4 °C) in zamrzovalnik (-20°C) (Electrolux, Švica)
- Invertni mikroskop TMS (Nikon, Japonska)
- Fluorescenčni mikroskop (Nikon, Japonska)
- Osebni računalnik za obdelavo slik
- Pipetor za pipete, Pipetboy (Integra, Švica)
- Magnetno mešalo
- Naprava z nastavki za vrtenje
- Tekoči dušik
- Grelni blok (Biometra, Nemčija)
- Zamrzovalnik (- 80°C). (HetoHoIten, Danska)
- Zaščitna mikrobiološka komora (Iskra Pio, Slovenija)
- Vodna kopel (GFL, Nemčija)

3.3.2 Izolacija hondrocitov iz hrustančnega tkiva

Transportne lončke s transportno tekočino in vzorci odvzetega tkiva smo stehtali na analitski tehtnici ter vzorce prenesli v zaščitno mikrobiološko komoro. Košček tkiva posameznega darovalca smo s pinceto prenesli v petrijevko in s pomočjo skalpela in pincete najprej odstranili morebitne ostanke perihondrija, nato pa smo hrustanec razrezali na majhne koščke (približno 1mm³).

V prvem delu poskusov, kjer smo želeli določiti vpliv različnih encimskih mešanic in fizikalnih pogojev razgradnje (mirovanja, vrtenja in mešanja) na številčnost ter odstotek živih celic, smo koščke tkiva prenesli v centrifugirke ali čaše z 10 ml encimske mešanice z 0,1 %, 0,3 % in 0,5 % kolagenazo ter mešanico 0,5 % kolagenaze II in 0,5 % tripsina. Po tri centrifugirke z 0,1 %, 0,3 % in 0,5 % kolagenazo ter dve z encimsko mešanico 0,5 % kolagenaze II in 0,5 % tripsina, v katere smo predhodno namestili koščke tkiva, smo postavili v inkubator. Enako smo storili v primeru vrtenja, le da smo tokrat centrifugirke z encimskimi mediji in koščki tkiva namestili v valje naprave za vrtenje, tako da so se vzorci tekom celotne inkubacije vrteli. V primeru mešanja pa smo 10 ml posameznih encimskih medijev namesto v centrifugirke odpipetirali v steklene čaše, saj smo poleg koščkov tkiva v vsako čašo vnesli tudi magnet, ki je ob namestitvi čaš na magnetna mešala mešal encimski medij. Število vzorcev s posameznim encimskim medijem je bilo v primeru mirovanja, vrtenja in mešanja enako (po trije vzorci z 0,1 %, 0,3 % in 0,5 % kolagenazo ter dva z encimsko mešanico 0,5 % kolagenaze II in 0,5 % tripsina). Živost in številčnost celic smo spremljali po 3., 6. in 21. urah razgradnje.

Sestava različnih encimskih medijev za razgradnjo hrustančnega tkiva (10 ml), ki smo jih uporabili v prvem delu poskusov.

Encimski medij z 0,1 % kolagenazo:

- 10 mg kolagenaze II
- 10 µl gentamicina
- 80 µl fungizona
- do 10 ml gojišča D-MEM/F-12

Encimski medij z 0,3 % kolagenazo:

- 30 mg kolagenaze II
- 10 µl gentamicina
- 80 µl fungizona
- do 10 ml gojišča D-MEM/F-12

Encimski medij z 0,5 % kolagenazo:

- 50 mg kolagenaze II
- 10 µl gentamicina
- 80 µl fungizona
- do 10 ml gojišča D-MEM/F-12

Encimska mešanica 0,5 % kolagenaze II in 0,5 % tripsina:

- 50 mg kolagenaze II
- 10 μ l gentamicina
- 80 μ l fungizona
- 100 μ l tripsin (0,5g/ml trypsin stock)
- do 10 ml gojišča D-MEM/F-12

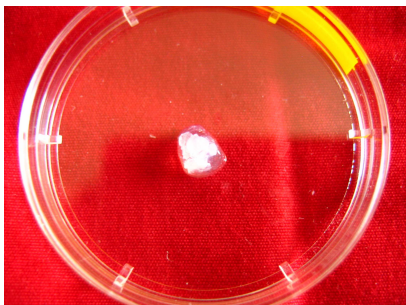
Medij za razgradnjo hrustančnega tkiva smo v vseh primerih pred uporabo sterilno prefiltrirali.

V drugem delu diplomske naloge, kjer je bil naš namen predvsem spremljati spremembo fenotipa elastičnega hrustanca pri celicah, gojenih v enosloju in tridimenzionalni kulturi (alginat) ter rezultate primerjati s fenotipom celic hialinega hrustanca, smo koščke tkiva posameznega darovalca prenesli v 50 ml cetrifugirke z 10 ml medija za encimsko razgradnjo. Centrifugirke smo površinsko očistili in jih vnesli v CO₂ inkubator, kjer je potekala inkubacija 18 ur pri 37 °C.

Vzorci smo po 18 urah razgradnje vzeli iz inkubatorja in razgrajeno hrustančno tkivo prelili preko celičnega sita (premer por je 40 μ m). Centrifugirke s celično suspenzijo posameznega darovalca smo centrifugirali 5 minut pri 300 $\times$ g na sobni temperaturi ter odlili supernatant. Celično usedlino smo nato se dvakrat sprali, tako da smo usedlino s stresanjem na električnem mešalniku in s pomočjo pipete resuspendirali v DMEM/F-12 mediju, ki je vseboval 15 % FBS in gentamicin (50 μ g/ml) ter nato centrifugirke s celično suspenzijo ponovno centrifugirali (5 minut pri 300 $\times$ g). Iz končne suspenzije celic smo odvzeli 20 μ l vzorca, celice prešteli in določili odstotek živih celic z raztopino tripanskega modrila.

3.3.3 Gojenje celic v enosloju in v alginatnem hidrogelu

Izolirane celice smo po spiranju istočasno nasadili v enosloj in tridimenzionalni nosilec (alginatni hidrogel). 75 000 celic (3000 celic/cm²) posameznega darovalca smo nasadili v posodo za gojenje celičnih kultur s površino 25 cm², v katero smo pred tem dodali 5 ml gojilnega medija DMEM s 15 % heterolognim humanim serumom in gentamicinom (50 μ g/ml). Gojilne posode smo zaprli, površinsko očistili in za 7 dni prenesli v CO₂ inkubator.



Slika 9: Nosilec iz alginatnega hidrogela.

V sterilnih pogojih smo s pomočjo PBS pripravili 1 % raztopino alginata (MediAlg MG17, Švica). Izračunali smo ustrezen volumen alginata in volumen celične suspenzije posameznega darovalca, ki ju potrebujemo za doseg celične gostote 1×10^6 celic/ml. Dobljenim suspenzijam alginata in celic smo dodali 250 mM CaCl_2 (Merck, Nemčija) in pustili 15 minut, da je prišlo v kalupih (premera 7 mm) do formacije diskov. Po tvorbi gela smo diske (premera 7 mm in visoke 2 mm) odstranili iz kalupov, jih sprali s PBS in jih s spatulo prenesli v posamezne luknje gojilne plošče s šestimi luknjami. Vsakemu disku smo dodali gojilni medij za hondrocite, ki je bil enak kot v primeru enoslojnih kultur, ploščo očistili in za teden dni postavili v CO_2 inkubator.

3.3.4 Dohranjevanje celičnih kultur hondrocitov

Kulture hondrocitov smo tekom 7 dnevnega gojenja 2 krat dohranili. Izrabljen gojilni medij smo s pipeto odstranili iz gojilnih posod z enoslojnimi kulturami celic in iz gojilnih plošč z luknjami, v katere smo namestili alginatne diske s hondrociti, in ga nadomestili z ustreznim volumnom svežega gojilnega medija, segretega na 37°C .

3.3.5 Tripsinizacija celičnih kultur

Po enotedenskem gojenju smo enoslojne celične kulture obdelali s tripsinom. Tripsin je encim, ki celice odlepi od dna gojilne posode.

Iz posod za gojenje celičnih kultur s površino 25 cm^2 smo najprej odstranili izrabljen gojilni medij in ga nadomestili s sterilno filtrirano raztopino za spiranje (HBSS). Posode smo približno 15 sekund rahlo stresali, nato pa raztopino za spiranje odpipetirali. V posode smo nato dodali 5 ml 0,5 % raztopine tripsin/EDTA in jih za 5 minut postavili v inkubator (37°C in 5 % CO_2). Celice so se po dodatku tripsina pričele sproščati z dna in tako ustvarile suspenzijo celic. Celično suspenzijo iz posamezne gojilne posode smo odsesali in jo prenesli v centrifugirko (15 ml) ter dodali 5 ml gojilnega medija. Centrifugirke s suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri $300 \times g$ na sobni temperaturi. Supernatant smo odlili in ponovili spiranje z gojilnim medijem. Iz končne suspenzije celic smo odvzeli 20 μl vzorca, prešteli celice in določili odstotek živih celic z raztopino tripanskega modrila.

3.3.6 Štetje celic in določanje odstotka živih celic s tripanskim modrilom

Po 3., 6. in 21. urah razgradnje tkiva v različnih encimskih mešanicah med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem smo celice prešteli in določili odstotek živih celic. Iz mešanice za razgradnjo smo odvzeli 20 μ l vzorca in mu dodali enak volumen raztopine tripanskega modrila. Tripansko modrilo vstopa izključno v mrtve celice, ki se zato obarvajo modro in jih ločimo od neobarvanih živih celic. S pipeto smo 20 μ l mešanice vzorca in tripanskega modrila prenesli pod krovno steklo hemocitometra in prešteli žive in mrtve celice v obeh poljih (posamezno polje sestavlja 9 kvadratkov).

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

$$N = n \times R \times V \times 10^4$$

N - skupno število živih/mrtvih celic v suspenziji

n - število preštetihih živih/mrtvih celic v kvadratih/ število kvadratkov

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

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

Odstotek živih celic (%) = (število živih celic / število živih in mrtvih celic) x 100

3.3.7 Shranjevanje celic v tekočem dušiku

Celice, ki smo jih dobili po izolaciji iz biopsijskega tkiva ali po tripsinizaciji in jih nismo potrebovali za nadaljnje poskuse, smo zamrznili.

3.3.7.1 Postopek zamrzovanja celic

Določili smo skupno število celic v suspenziji in se odločili za število celic, ki jih želimo zamrzniti v posamezni epruvetki za zamrzovanje. Suspenzijo smo enakomerno razdelili v centrifugirke in jih centrifugirali 5 minut pri $300 \times g$ na sobni temperaturi. Supernatant smo odstranili in počasi (zaradi toksičnega vpliva dimetilsulfoksida na celice) ob steni dodali v celično usedlino 2 ml medija za zamrzovanje. Mešanico smo prenesli v ohlajene epruvetke za zamrzovanje, jih zaprli in namestili v posodo za počasno zmrzovanje MrFrosty. Po 24-urni inkubaciji na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo prenesli epruvetke v tekoči dušik ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Priprava medija za zamrzovanje (za 1 vzorec potrebujemo 2 ml medija):

- 1 ml seruma,
- 0,75 ml DMEM,
- 0,25 ml DMSO.

3.3.7.2 Postopek odmrzovanja celic

Epruvetko za zamrzovanje z zamrznjenimi hondrociti smo vzeli iz posode s tekočim dušikom in jo na hitro odtalili pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Med odtajevanjem smo celicam s pipeto dodajali serum in jih predstavljali v 50 ml centrifugirko. S hitrim delom in dodajanjem seruma preprečimo toksično delovanje dimetilsulfoksida (DMSO). Celicam smo nato dodali 10 ml gojilnega medija in homogenizirali suspenzijo s stresanjem na rotacijskem stresalniku. Spiranje smo ponovili, nato pa določili število in odstotek živih celic z raztopino tripanskega modrila.

3.3.8 Fotografiranje celic pod invertnim mikroskopom

Celice smo fotografirali neposredno po razgradnji tkiva in po gojenju v enosloju in alginatu. Povečavo, pod katero je bila narejena slika, smo določili glede na povečavo mikroskopa in glede na optično povečavo digitalnega fotoaparata Nikon E900.

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

3.4.1 Izolacija RNA

3.4.1.1 Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema

3.4.1.1.1 Kemikalije

- 75 % etanol, pripravljen iz 96 % (Pharmachem, Slovenija)
- DEPC (Sigma, ZDA)
- Izopropanol (Sigma, ZDA)
- Kloroform (Sigma, ZDA)
- Prečiščena voda (Ph. Eur. 4th; Zavod RS za transfuzijsko medicino)
- Trireagent (SigmaZDA)

3.4.1.1.2 Potrošni material

- Mokrocentrifugirke (Eppendorf, Nemčija)
- Nastavki za pipete; 10, 100 in 1000 µl (Costar, ZDA)
- Stojalo za centrifugirke in mikrocentrifugirke

3.4.1.1.3 Laboratorijska oprema

- Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- Centrifuga 5804 R (Eppendorf, Nemčija)
- Električni stresalnik, vortex (MS2 Minishaker IKA, ZDA)
- Grelni blok (Eppendorf, Nemčija)
- Spektrofotometer, BioPhotometer (Eppendorf, Nemčija)
- Vodna kopel (GFL, Nemčija)
- Zamrzovalnik (-80 °C) (Electrolux)

3.4.1.2 Odvzem vzorcev in priprava celic za RNA analize

Za izolacijo RNA smo v drugem delu poskusov pri vsakem od petih darovalcev shranili:

- vzorec biopsije
- vzorec enoslojne kulture po enotedenskem gojenju in tripsinizaciji
- alginate diske s hondrociti po enotedenskem gojenju

Vzorci enoslojnih kultur smo centrifugirali 5 minut pri $300 \times g$ na sobni temperaturi. Supernatant smo odlili in peletu dodali Trireagent (1 ml Trireagenta zadostuje za razkroj $5-10 \times 10^6$ celic). Pelet smo suspendirali s ponavljajočim pipetiranjem, nato pa lizat celic prenesli v mikrocentrifugirke. Vzorce biopsij in diske iz gela smo s pomočjo spatule prav tako prenesli v mikrocentrifugirke in dodali 1 ml Trireagenta. Tako pripravljene vzorce smo hranili v zamrzovalniku (-80°C) do analize.

3.4.1.3 Priprava reagentov potrebnih za izolacijo RNA

S pomočjo DEPC v reagentih za izolacijo RNA uničimo RNA-ze. Izopropanolu, 75 % etanolu in prečiščeni vodi smo dodali 0,1 % DEPC. Po dodatku smo raztopine pustili preko noči v inkubatorju (37°C), nato pa jih v vodni kopeli inkubirali 1 uro pri 80°C . Do uporabe smo jih hranili v hladilniku (4°C).

3.4.1.4 Postopek izolacije RNA

Mikrocentrifugirke s celičnim lizatom, ki smo jih hranili v zamrzovalniku (-80°C) smo vzeli iz njega in jih pustili 5 minut na sobni temperaturi (tako smo zagotovili popolno disociacijo nukleoproteinskih kompleksov). Dodali smo 0,2 ml kloroforma na 1 ml uporabljenega Trireagenta. Vzorce smo tesno zaprli, jih stresali na električnem stresalniku 15 sekund, nato pa jih pustili stati na sobni temperaturi od 2 do 15 minut. Sledilo je 15-minutno centrifugiranje pri $12000 \times g$ na 4°C . Po centrifugiranju se je mešanica razslojila v tri faze: rdečo organsko fazo (vsebuje proteine), interfazo (vsebuje DNA) in zgornjo, brezbarvno vodno fazo (vsebuje RNA). Vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in ji dodali 0,5 ml izopropanola na 1 ml uporabljenega Trireagenta. Vzorce smo premešali, nato pa jih pustili na sobni temperaturi od 5 do 10 minut. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri $12000 \times g$ na 4°C . Na dnu mikrocentrifugirk smo dobili oborino RNA. Supernatant smo odstranili in RNA pelete sprali z najmanj 1 ml 75 % etanola na 1 ml uporabljenega Trireagenta. Vzorce smo stresali na električnem stresalniku in jih centrifugirali 5 minut pri $7500 \times g$ na 4°C . Supernatant smo odlili in RNA pelete osušili na zraku (odprte mikrocentrifugirke smo pustili na zraku od 5 do 10 minut). Osušenim peletom smo dodali ustrezno količino prečiščene vode z 0,1 % DEPC in pospešili raztapljanje RNA s ponavljajočim pipetiranjem in 10- do 15-minutno inkubacijo pri 55 do 60°C . Čistost vzorca in koncentracijo RNA smo izmerili na spektrofotometru. Vzorce RNA smo do nadaljnje uporabe shranili v zamrzovalniku (-80°C).

3.4.2 Prepis RNA v DNA (obratna transkripcija)

3.4.2.1 Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema

3.4.2.1.1 Kemikalije

- High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, ZDA), ki vsebuje:
 - pufer za obratno transkripcijo (10x)
 - nukleotide dATP, dTTP, dCTP, dGTP (25x)
 - naključne začetne oligonukleotide (10x)
 - encim MultiScribe
- RNA-zni inhibitor (Applied Biosystems, ZDA)
- Prečiščena voda (Ph. Eur. 4th; Zavod RS za transfuzijsko medicino)

3.4.2.1.2 Potrošni material

- Mikrocentrifugirke (Eppendorf, Nemčija)
- Nastavki za pipete; 10, 100 in 1000 µl (Costar, ZDA)
- Stojalo za centrifugirke in mikrocentrifugirke

3.4.2.1.3 Laboratorijska oprema

- Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- Grelni blok (Eppendorf, Nemčija)
- Spektrofotometer, BioPhotometer (Eppendorf, Nemčija)
- Zamrzovalnik (-20 °C) (Electrolux)

3.4.2.2 Postopek prepisa RNA v cDNA

Celotno RNA smo prepisali v cDNA, upoštevajoč navodila za sestavo High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). RNA smo vzeli iz zamrzovalnika in prenesli v posodo z ledom. Po potrebi smo vzorce razredčili s prečiščeno vodo z 0,1 % DEPC.

Transkripcijsko mešanico smo v mikrocentrifugirkah (glede na število vzorcev) pripravili iz naslednjih reagentov (1 vzorec):

- 5 µl 10x pufera za obratno transkripcijo,
- 2 µl 25x dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP),
- 5 µl 10x naključnih začetnih oligonukleotidov,
- 2,5 µl encima MultiScribe,
- 2,5 µl RNA-znega inhibitorja (končna koncentracija 1U/µl),

- 1 µl RNA
- do 50 µl prečiščene vode z 0,1 % DEPC,

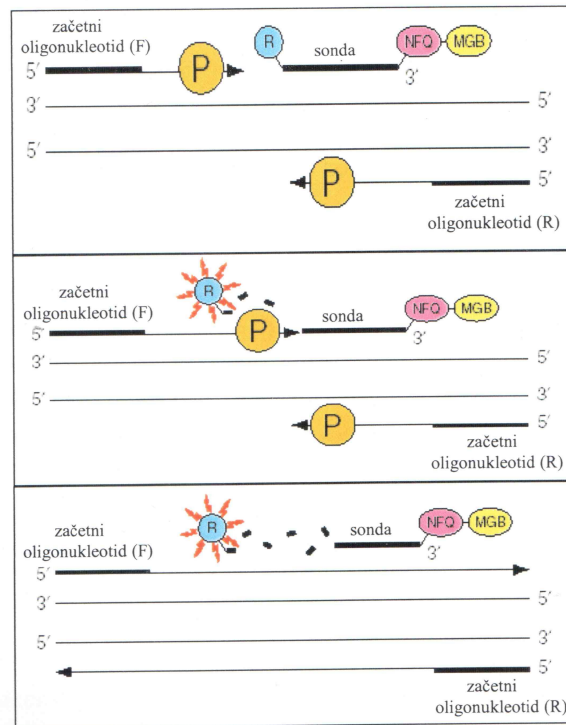
Mešanico smo inkubirali v grelnem bloku: 10 minut na 25°C , nato pa 2 uri na 37°C. Koncentracijo c DNA smo izmerili na spektrofotometru . Vzorce cDNA smo do nadaljnje uporabe shranili v zamrzovalniku (-20°C).

3.4.3 Analiza izražanja genov z verižno reakcijo pomnoževanja v realnem času

3.4.3.1 Način delovanja metode RT-PCR

Verižna reakcija pomnoževanja v realnem času je kvantitativna metoda za ugotavljanje količine mRNA v celici, ki za razliko od klasičnega PCR, nastajanje produkta zazna, ko je le-ta v eksponencialni fazi pomnoževanja in ne, ko je že dosežen plato. Je izredno občutljiva in omogoča določanje nizkega nivoja izražanja genov. Temelji na: prepisu mRNA v cDNA s pomočjo reverzne transkriptaze, pomnoževanju tarčne cDNA, detekciji in kvantifikaciji pomnoženega produkta s pomočjo fluorescenčnih označevalcev. Dobra lastnost metode je tudi ta, da poteka le nekaj ur in se jo lahko deloma avtomatizira (Fennell in sod., 2005; Espy in sod., 2006).

Pri metodi gre za pomnoževanje tarčne cDNA na katero se poleg začetnih oligonukleotidov veže še fluorescenčno označena sonda (Taqman sonda), ki se specifično prilega na zaporedje med obema začetnima oligonukleotidoma. Sonda je kratko zaporedje DNA, ki ima na 5- koncu vezano reportersko fluorescentno barvilo in na 3- koncu dušilec fluorescence, ki v nerazgrajeni sondi absorbira fluorescenco reporterskega barvila. Seveda obstajajo sonde z različnimi reporterskimi in dušilnimi barvili. V našem primeru smo uporabili sondo, ki ima kot reportersko barvilo vezan 6-karboksifluorescin (FAMTM) in kot dušilec 6-karboksi-tetrametil-rodamin (TAMRATM). Med pomnoževanjem DNA polimeraza s svojo eksonukleazno aktivnostjo odcepi sondo in posledično se sprostita tudi obe barvili, ki sta sedaj ločeni, kar onemogoči dušenje emisijskega spektra, ki ga oddaja reportersko barvilo (FAMTM). Fluorescenca med pomnoževanjem cDNA narašča in sicer sorazmerno s količino odcepljenih sond, ki pa je prav tako sorazmerna s količino nastalega produkta. Cikel, pri katerem fluorescenca (krivulja pomnoževanja cDNA) prvič preseže 10-kratnik standardne deviacije sevanja bazne linije imenujemo Ct ali mejni cikel (Cycle threshold). Le-ta je obratnosorazmerna začetni koncentraciji cDNA v vzorcu (Dieffenbach in Dveksler, 2003; Rapley in Harbron, 2004; Flohlich, 2004).



Slika 10: Prikaz pomnoževanja tarčne cDNK (Taqman® Gene Expression Assays-Protocol, 2004).

3.4.3.2 Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema

3.4.3.2.1 Kemikalije

- Osnovna zmes - TaqMan® Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems, ZDA)
- Prečiščena voda (Ph. Eur. 4th; Zavod RS za transfuzijsko medicino)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen kolagen II (TaqMan® Gene Expression Assays-Assays on Demand™, Applied Biosystems, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen kolagen I (TaqMan® Gene Expression Assays-Assays on Demand™, Applied Biosystems, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen agrekan (TaqMan® Gene Expression Assays-Assays on Demand™, Applied Biosystems, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen verzikan (TaqMan® Gene Expression Assays-Assays on Demand™, Applied Biosystems, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen elastin (TaqMan® Gene Expression Assays Assays on Demand™, Applied Biosystems, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen GAPDH (Human GAPDH Endogenous Control, Applied Biosystems, ZDA)

3.4.3.2.2 Potrošni material

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

3.4.3.2.3 Laboratorijska oprema

- Apart ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, ZDA)
- Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- Centrifuga (Tehtnica, PLC 332, Slovenija)
- Kadička z ledom

3.4.3.3 Verižna reakcija pomnoževanja v realnem času

Mikrocentrifugirke z vzorci cDNA smo vzeli iz zamrzovalnika in prenesli v kadičko z ledom. Vzorce smo redčili s prečiščeno vodo z 0,1 % DEPC v razmerju 1 : 1.

V mikrocentrifugirkah smo posebej za vsak gen (kolagen II, kolagen I, agrekan, verzikan, elastin in GADPH, ki služi kot endogena kontrola) zmešali ustrezno količino reagentov in pripravili reakcijsko mešanico, ki smo jo prenesli na led. Sonde in začetne oligonukleotide smo med pripravo reakcijske zmesi zaščitili pred svetlobo s pomočjo aluminijske folije. Sestava reakcijske mešanice za 1 vzorec (20 µl):

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

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

pri 95 °C in 40 ciklov pomnoževanja, ki so bili sestavljeni iz 15-ih sekund pri 95 °C in 1 minute pri 60 °C.

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

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

Vrednost relativnega izražanja genov smo za potrebe primerjanja posameznih vzorcev normalizirali s pomnoževanjem/deljenjem s 100.

3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Rezultate izolacije hondrocitov pri različnih pogojih razgradnje (različni encimski mediji, čas razgradnje in inkubacija (mirovanje, vrtenje in mešanje) smo prikazali kot povprečne vrednosti (Slika 1, Slika 2 in Slika 3). Pri vsakem setu podatkov smo prikazali tudi standardno deviacijo, ki je zaradi majhnega števila vzorcev in velike biološke raznolikosti v večini primerov velika. Za statistično vrednotenje razlik med vzorci inkubiranimi med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem (po enakem času gojenja in v enaki encimski mešanici) smo izbrali in izvedli neparametrični Fridmanov test. Kot značilne smo opredelili tiste razlike, pri katerih smo z izbrano metodo dokazali, da je verjetnost ničelne hipoteze manjša od 5 % ($p < 0.05$).

V diplomski nalogi smo spremljali tudi odstotek živih celic v odvisnosti od trajanja razgradnje (tri, šest in enaindvajset urna razgradnja), različnih encimskih mešanic (0,1 %, 0,3 % in 0,5 % kolagenaza II ter mešanica 0,5 % kolagenaze in 0,5 % tripsina) in inkubacije pri različnih pogojih (mirovanje, vrtenje in mešanje). Rezultate smo tudi v tem primeru v treh grafih prikazali (Slika 4, Slika 5 in Slika 6) kot povprečne vrednosti s prikazanimi standardnimi deviacijami ter razlike med rezultati vzorcev mirovanja, vrtenja in mešanja statistično ovrednotili s Fridmanovim testom ($p < 0.05$).

Primerjavo rezultatov ekspresij za posamezen gen (kolagen II, kolagen I, verzikan, agrikan in elastin) med vzorci biopsij, enoslojnimi in tridimenzionalnimi kulturami hondrocitov smo statistično vrednotili z neparametričnimi testi. S Fridmanovim testom smo najprej preverili, če lahko govorimo o značilnih razlikah, nato pa smo opravili še parne primerjave med rezultati biopsij, enoslojnih in tridimenzionalnih kultur z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov. Kot značilne smo opredelili tiste razlike, pri katerih smo z izbrano metodo dokazali, da je verjetnost ničelne hipoteze manjša od 5 % ($p < 0.05$). Statistična analiza je bila narejena z računalniškim programom SPSS 13.0 za Windows.

4 REZULTATI

4.1 ŠTEVILO IZOLIRANIH IN DELEŽ ŽIVIH IZOLIRANIH HONDROCITOV: VPLIV ČASA RAZGRADNJE, RAZLIČNIH ENCIMSKIH MEDIJEV TER INKUBACIJE MED MIROVANJEM, VRTENJEM IN MEŠANJEM

4.1.1 Število izoliranih hondrocitov

Prvi korak pri zdravljenju hrustančnih in drugih poškodb s pomočjo tkivnega inženirstva predstavlja izolacija hondrocitov iz biopsijskega vzorca. Število izoliranih celic smo spremljali po tri, šest in enaindvajset urni encimski razgradnji humanega ušesnega elastičnega hrustanca v različnih medijih za razgradnjo (0,1 %, 0,3 % in 0,5 % kolagenazi II ter mešanici 0,5 % kolagenaze II in 0,5 % tripsina), ki smo jih inkubirali pri različnih pogojih (mirovanje, vrtenje in mešanje). Ugotavljali smo namreč vpliv različnih koncentracij encima kolagenaze II, dodatka tripsina in trajanja razgradnje ter vpliv inkubacije pri različnih pogojih (mirovanje, vrtenje, mešanje) na število izoliranih celic. Število celic smo določili z metodo barvanja s tripsanskim modrilom.

Rezultate poskusov razgradnje humanega elastičnega hrustanca po različnem trajanju razgradnje v različnih encimskih mešanicah med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem smo zaradi boljše preglednosti prikazali v treh ločenih grafih. Vpliv časa razgradnje in različnih encimskih mešanic na število izoliranih celic smo prikazali ločeno za mirovanje (Slika 11), vrtenje (Slika 12) in mešanje (Slika 13).

Pri pregledu rezultatov moramo upoštevati, da zaradi majhnega števila vzorcev in morebitnih napak pri štetju izoliranih celic s hemocitometrom rezultati niso dovolj zanesljivi in nam lahko služijo zgolj kot orientacija za morebitne nadaljnje poskuse. Slednjo trditev potrjujejo velike standardne deviacije, ki kažejo, da so med posameznimi vzorci, ki smo jih inkubirali pri enakih pogojih, precejšnje razlike v številu prešteti celic.

Ker je bil naš namen določiti tudi vpliv vrtenja vzorcev in mešanja encimskega medija z magnetnim mešalom na število izoliranih celic, smo število izoliranih celic/mg inkubiranega tkiva med vrtenjem in mešanjem primerjali s številom celic pri vzorcih inkubiranih v enakih encimskih mešanicah in po enakem času razgradnje med mirovanjem. Primerjavo rezultatov vzorcev inkubiranih med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem smo statistično vrednotili s Friedmanovim testom ($p < 0,05$), ki ni pokazal statistično značilnih razlik med vrednostmi. Glede na rezultate tako ne moremo potrditi, da bi vrtenje oziroma mešanje pospešilo izolacijo celic elastičnega hrustanca in skrajšalo postopek razgradnje.

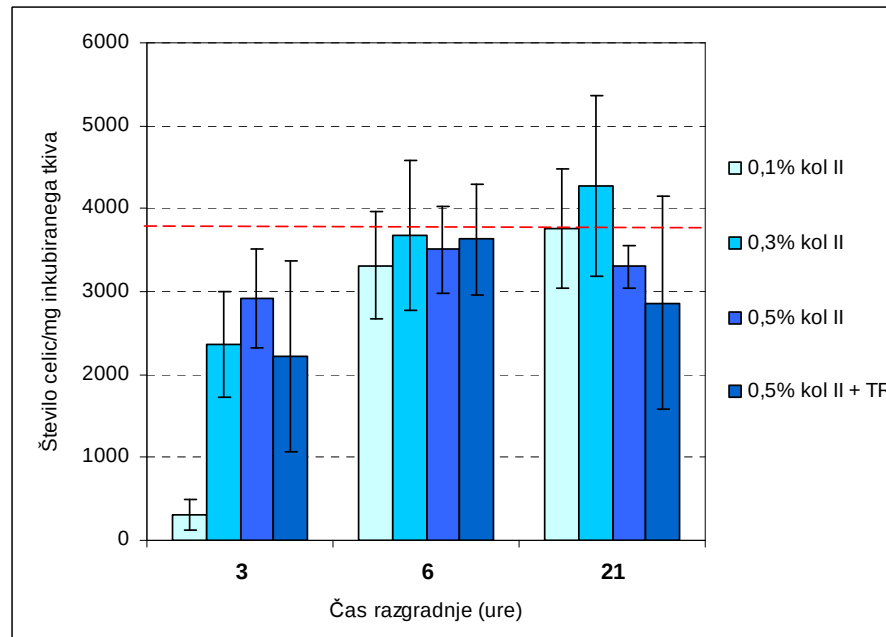
Najmanjše število izoliranih celic smo v vseh primerih inkubacije (med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem) prešteli po treh urah razgradnje tkiva v 0,1 % kolagenazi II. Najnižja povprečna vrednost (310 celic/mg inkubiranega tkiva, $SD=186$ ($N=3$)) je bila ugotovljena pri vzorcih, ki smo jih med mirovanjem inkubirali pri omenjenih pogojih. Po pričakovanjih je bilo število izoliranih celic v primeru vseh encimskih mešanic med

mirovanjem, vrtenjem in mešanjem po šest urni razgradnji večje kot po treh urah. Povečanje števila celic/mg inkubiranega tkiva po enaindvajsetih urah razgradnje v primerjavi s šestimi urami je bilo manjše od naših pričakovanj in je bilo opazno predvsem pri vzorcih z 0,1 % in 0,3 %, kolagenazo II. Najvišja povprečna vrednost (4720 celic/mg inkubiranega tkiva, SD=1915 (N=3)) je bila prešteta pri vzorcih, ki smo jih 21 ur inkubirali v encimski mešanici 0,5 % kolagenaze II in jih ves čas razgradnje vrteli.

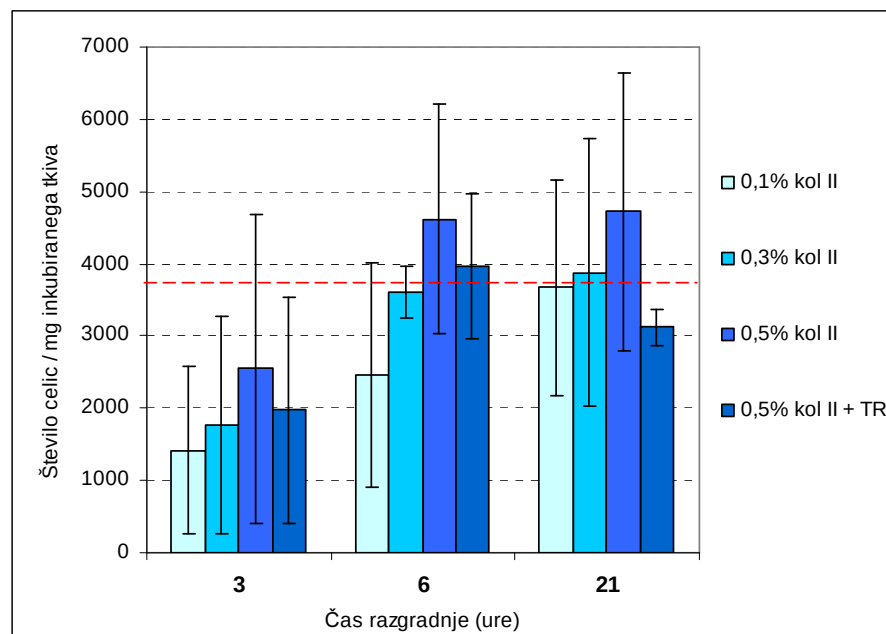
Rezultati v večji meri potrjujejo, da z višjo koncentracijo kolagenaze II v mediju za razgradnjo po enakem času inkubacije izoliramo večje število celic/mg inkubiranega tkiva. Ta razlika v številu izoliranih celic je bila v večini primerov najbolj opazna po tri in šest urni razgradnji in pri vzorcih z 0,3 % in 0,5 % kolagenazo II glede na vzorce z 0,1 % kolagenazo II. Glede na rezultate nismo ugotovili, da bi imel dodatek tripsina v medij z 0,5 % kolagenazo glede na izolirano število celic v mediju z 0,5 % kolagenazo II brez tripsina učinek na število izoliranih celic/mg inkubiranega tkiva.

Slednje se sklada tudi z našimi opažanji razgradnje inkubiranega tkiva po tri, šest in enaindvajset urni razgradnji v posameznih encimskih medijih. Po tri urni razgradnji med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem so bili pri vseh vzorcih vidni koščki nerazgrajenega tkiva. Največ jih je bilo v mediju z 0,1 % kolagenazo, najmanj pa v mediju z 0,5 % kolagenazo in 0,5 % kolagenazo z dodatkom tripsina. Podobno je bilo po 6 urni inkubaciji, le da so bili v tem primeru koški nerazgrajenega tkiva manjši in v primeru 0,5 % kolagenaze in 0,5 % kolagenaze z dodatkom tripsina komaj opazni. Po enaindvajset urni razgradnji je bilo nerazgrajeno tkivo vidno pri vzorcih z 0,1 % kolagenazo in komaj opazno pri 0,3 % kolagenazi, medtem ko v medijih z 0,5 % kolagenazo in 0,5 % kolagenazo z dodatkom tripsina ni bilo vidnih ostankov nerazgrajenega tkiva. V nobenem primeru nismo opazili razlik pri ostankih nerazgrajenega tkiva glede na inkubacijo med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem.

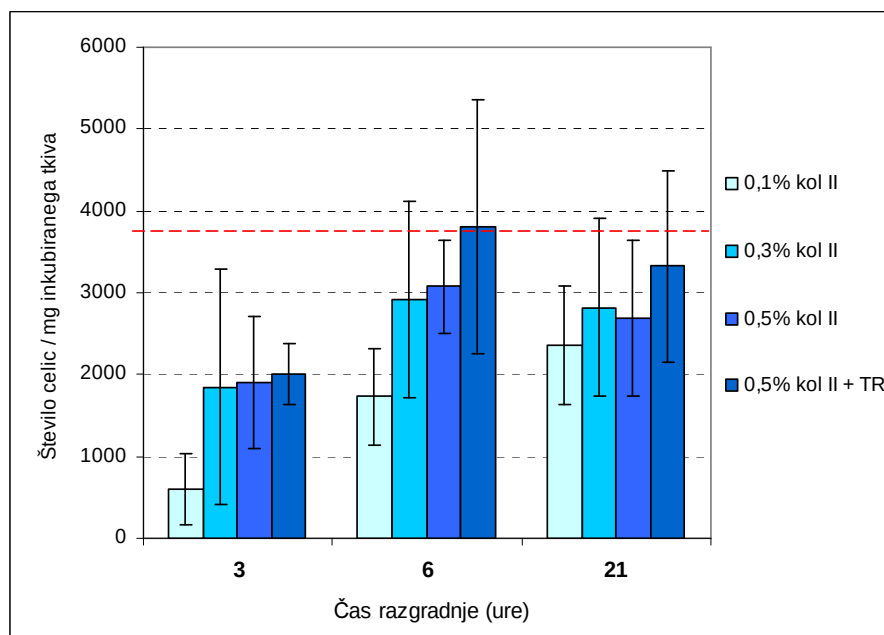
Za izolacijo celic humanega elastičnega hrustanca v klinične namene se pogosto uporablja enaindvajset urna razgradnja tkiva med mirovanjem v mediju z 0,1 % kolagenazo II. V našem primeru smo po inkubaciji treh vzorcev pri omenjenih pogojih izolirali povprečno 3761 celic/mg (SD=725, N=3) inkubiranega tkiva. Omenjeno povprečno vrednost smo na grafih (Slika 12, Slika 13 in Slika 14) prikazali z rdečo črtkano črto, saj predstavlja mejo, ki smo jo želeli doseči oziroma preseči, da bi lahko govorili o ugodnejših pogojih razgradnje. Do opaznega presega omenjene vrednosti je prišlo v primeru šest (4622 celic/mg, SD= 1594, N=3) in enaindvajset urne (4720 celic/mg, SD=1915) razgradnje v mediju z 0,5 % kolagenazo med vrtenjem ter v primeru enaindvajset urne razgradnje v 0,3 % kolagenazi (4274 celic/mg, SD=1086, N=3) med mirovanjem, vendar zaradi velikih standardnih deviacij omenjeni rezultati niso reprezentativni.



Slika 11: Vpliv časa razgradnje in različnih encimskih mešanic na število izoliranih celic pri vzorcih inkubiranih med mirovanjem. Prikazane so povprečne vrednosti in SD, N(0,1 % kol. II)=3, N(0,3 % kol. II)=3, N(0,5 % kol. II)=3 in N(0,1 % kol. II + TR)=2.



Slika 12: Vpliv časa razgradnje in različnih encimskih mešanic na število izoliranih celic pri vzorcih inkubiranih med vrtenjem. Prikazane so povprečne vrednosti in SD, N(0,1 % kol. II)=3, N(0,3 % kol. II)=3, N(0,5 % kol. II)=3 in N(0,1 % kol. II + TR)=2.



Slika 13: Vpliv časa razgradnje in različnih encimskih mešanic na število izoliranih celic pri vzorcih inkubiranih med mešanjem. Prikazane so povprečne vrednosti in SD, $N(0,1\% \text{ kol. II})=3$, $N(0,3\% \text{ kol. II})=3$, $N(0,5\% \text{ kol. II})=3$ in $N(0,1\% \text{ kol. II} + \text{TR})=2$.

4.1.2 Delež živih izoliranih hondocitov

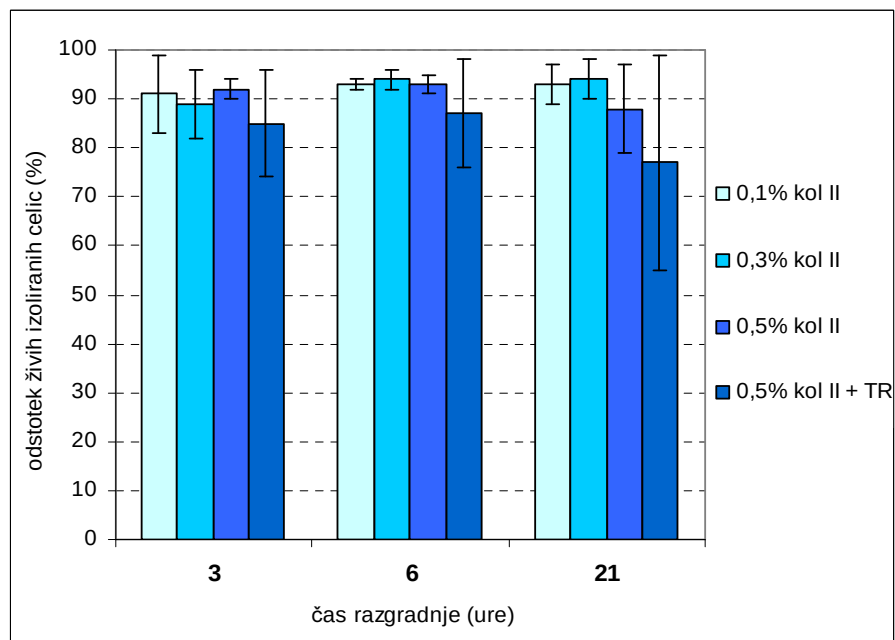
Pri izolaciji hrustančnih celic v klinične namene je pomembno, da je živost izoliranih celic čim višja. Zato smo pri omenjenih poskusih poleg samega števila celic spremljali tudi vpliv trajanja razgradnje (tri, šest in enaindvajset urna razgradnja), različnih encimskih mešanic (0,1 %, 0,3 % in 0,5 % kolagenaza II ter mešanica 0,5 % kolagenaze in 0,5 % tripsina) in inkubacije pri različnih pogojih (mirovanje, vrtenje in mešanje) na živost izoliranih celic.

Po tri, šest in enaindvajset urni razgradnji smo za tri vzorce (oziroma dva v primeru mešanice 0,5 % kolagenaze II in 0,5 % tripsina) inkubirane v določenem encimskem mediju med mirovanjem, vrtenjem ali mešanjem določili odstotek živih izoliranih celic z metodo barvanja s tripanskim modrilom in opazovanjem pod svetlobnim mikroskopom. Dobljene rezultate smo v odvisnosti od časa razgradnje in različnih encimskih mešanic zaradi boljše preglednosti prikazali ločeno za mirovanje (Slika 11), vrtenje (Slika 12) in mešanje (Slika 13). Tudi v tem primeru nam rezultati zaradi majhnega števila vzorcev in velikih standardnih deviacij niso reprezentativni in lahko služijo zgolj kot orientacija za morebitne nadaljnje poskuse.

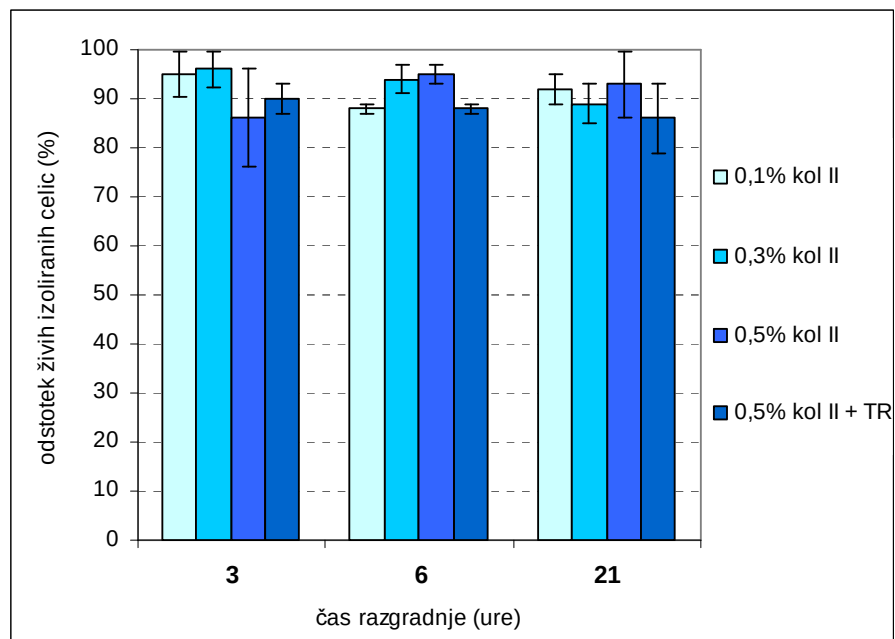
Pri določanju odstotka živih izoliranih celic je bila najnižja povprečna vrednost (64 %, SD=11 (N=2)) ugotovljena pri vzorcih, ki smo jih 21 ur inkubirali v encimski mešanici 0,5 % kolagenaze II in 0,5 % tripsina, katero smo ves čas mešali z magnetnim mešalom. Tudi sicer so bile najnižje vrednosti odstotka živih celic med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem opažene v vzorcih, ki so vsebovali dodatek tripsina. Višje vrednosti (96 %, 95 %, 94%) so bile največkrat ugotovljene pri vzorcih z 0,1 % in 0,3 % kolagenazo II, ki smo jih inkubirali med mirovanjem in vrtenjem.

Glede na odstotke živih celic pri različnih časih razgradnje nismo ugotovili korelacije med znižanjem živosti celic in daljšanjem trajanja razgradnje. Podobno velja za inkubacijo v encimskem mediju z različno koncentracijo kolagenaze II, saj nismo opazili tendence zmanjšanja odstotka živih celic pri vzorcih z 0,3 % in 0,5 % kolagenazo II glede na vzorce z 0,1 % kolagenazo II. Nasprotno velja za vzorce z dodatkom tripsina, ki med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem kažejo nekoliko nižje odstotke živih celic.

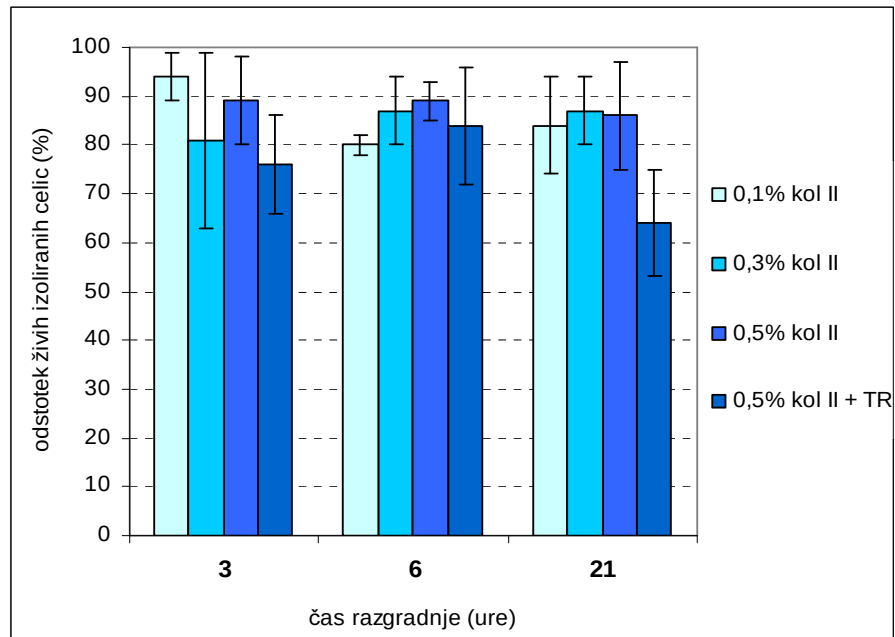
Pri primerjavi odstotkov živih izoliranih celic glede na inkubacijo med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem lahko pri večini setov podatkov opazimo, da so odstotki pri vzorcih, katerih encimsko mešanico smo tekom razgradnje mešali z magnetnim mešalom, nekoliko nižji kot v primeru mirovanja in vrtenja. Statističnih razlik, izračunanih s Friedmanovim testom ($p < 0,05$), med vrednostmi vzorcev inkubiranih med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem nismo dokazali.



Slika 14: Vpliv časa razgradnje in različnih encimskih mešanic na odstotek živih izoliranih celic pri vzorcih inkubiranih med mirovanjem. Prikazane so povprečne vrednosti in SD, $N(0,1 \% \text{ kol. II})=3$, $N(0,3 \% \text{ kol. II})=3$, $N(0,5 \% \text{ kol. II})=3$ in $N(0,1 \% \text{ kol. II} + \text{TR})=2$.



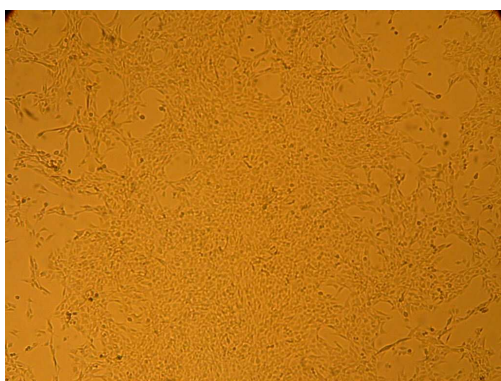
Slika 15: Vpliv časa razgradnje in različnih encimskih mešanic na odstotek živih izoliranih celic pri vzorcih inkubiranih med vrtenjem. Prikazane so povprečne vrednosti in SD, $N(0,1 \% \text{ kol. II})=3$, $N(0,3 \% \text{ kol. II})=3$, $N(0,5 \% \text{ kol. II})=3$ in $N(0,1 \% \text{ kol. II} + \text{TR})=2$.



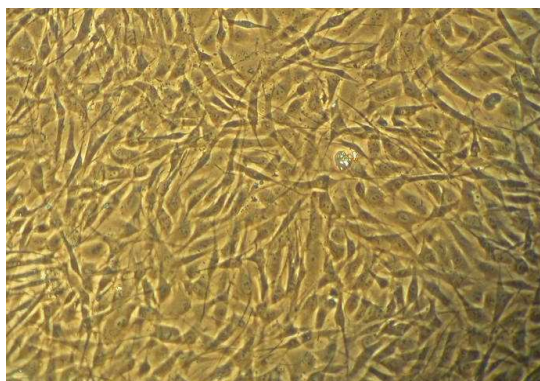
Slika 16: Vpliv časa razgradnje in različnih encimskih mešanic na odstotek živih izoliranih celic pri vzorcih inkubiranih med mešanjem. Prikazane so povprečne vrednosti in SD, $N(0,1\% \text{ kol. II})=3$, $N(0,3\% \text{ kol. II})=3$, $N(0,5\% \text{ kol. II})=3$ in $N(0,1\% \text{ kol. II} + \text{TR})=2$.

4.2 OBLIKA HONDROCITOV, GOJENIH V ENOSLOJNI IN TRIDIMENZIONALNI KULTURI (ALGINATU)

Celice smo z invertnim mikroskopom opazovali neposredno po razgradnji ter po nasaditvi v gojilne posode (enoslojne celične kulture). Izolirani hondrociti so po izolaciji kazali značilno okroglo obliko. Celice so se nekaj ur po nasaditvi začele pritrjevati na dno gojilne posode in iz kroglaste prešle v vretenasto fibroblastno obliko. Celice po enotedenskem gojenju v enosloju so bile majhne, vretenaste in tesno ena ob drugi (Slika 17). Omenjena sprememba oblike je eden prvih dokazov dediferenciacije hondrocitov v enoslojni celični kulturi.



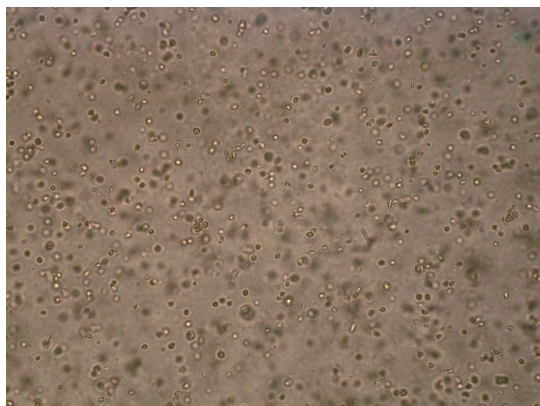
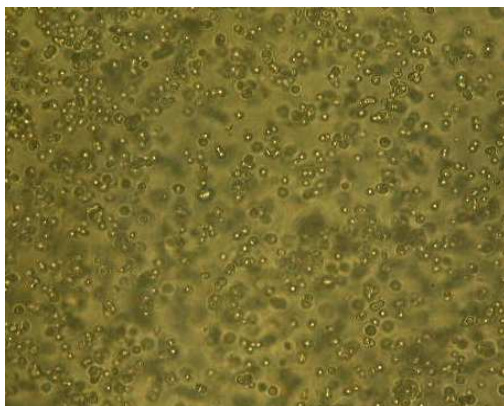
a)



b)

Slika 17: Fotografiji primarnih kultur hondrocitov po enotedenskem gojenju v enosloju. a) Primarna kultura hondrocitov, 40-kratna povečava; b) Primarna kultura hondrocitov; 100-kratna povečava.

Pri hondrocitih nasajenih v diske iz alginata nismo opazili spremembe v vretenasto fibroblastno obliko (Slika 18). Ohranjena okroglasta oblika celic je bila prvi dokaz, da je stopnja dediferenciacija celic, gojenih znotraj alginata, manjša kot pri celicah, gojenih v enoslojnih kulturah.



Slika 18: Fotografiji primarnih kultur hondrocitov po enotedenskem gojenju v alginatnem hidrogelu, 40-kratna povečava.

4.3 IZRAŽANJE GENOV HONDROCITOV, GOJENIH V ENOSLOJNI IN TRIDIMENZIONALNI KULTURI

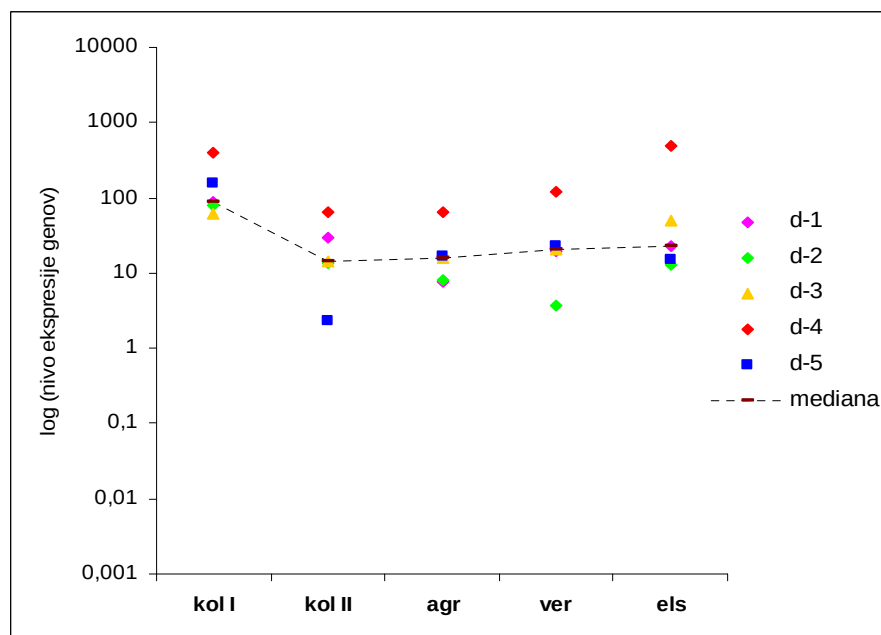
Hondrocyte petih darovalcev smo sedem dni vzporedno gojili v enoslojnih kulturah in tridimenzionalnem okolju gela iz alginata (poglavje 3.3.3.1). Po sedmih dneh smo vzorce hondrocitov lizirali s pomočjo lizirajočega pufra, izolirali celično mRNA in jo prepisali v cDNA (poglavje 3.4.1 in 3.4.2). Izražanje genov matriksa smo določili z metodo RT-PCR, pri kateri smo pomnoževali cDNA kolagena II, kolagena I, verzikana, agrekana in elastina (poglavje 3.4.3). Rezultate meritev smo statistično vrednotili z neparametričnimi testi s pomočjo programov SPSS 13.0 in MS Excel.

Rezultate nivoja izražanja genov (kol II, kol I, agr, ver in els), smo grafično ločeno prikazali za vzorce biopsij (Slika 19), enoslojne celične kulture (Slika 20) in tridimenzionalne kulture (Slika 21). Vsak set podatkov za posamezen gen sestavljajo rezultati izražanja petih darovalcev in mediana, ki smo jo vključili zaradi velike biološke spremenljivosti med vzorci darovalcev.

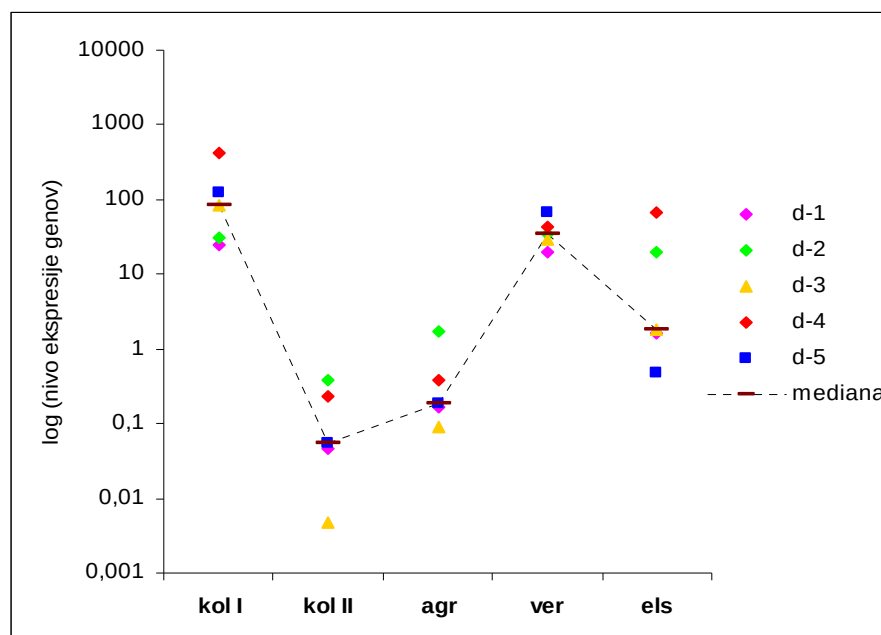
Nivo izražanja posameznih genov za makromolekule izvenceličnega matriksa se je pri petih darovalcih precej razlikoval. Največjo spremenljivost v izražanju genov med vzorci darovalcev smo opazili pri hondrocitih, ki smo jih sedem dni gojili znotraj alginatnih hidrogelov. Izražanje gena za kolagen II se je pri teh celicah med posameznimi vzorci razlikovalo do 323-krat, za kolagen I do 26-krat, za agrekan do 157-krat, za verzikan do 45-krat ter za elastin celo do 514-krat. Manjša spremenljivost v izražanju posameznih genov je bila opažena pri hondrocitih iz biopsijskih vzorcev in hondrocitih, gojenih v enosloju. Kljub razlikam v nivoju izražanja genov med posameznimi darovalci pa pri vzorcih opazimo enak trend spreminjanja izražanja genov makromolekul matriksa pri posameznih pogojih gojenja (enosloj in tridimenzionalna kultura).

Nivo izražanja pri vzorcih biopsij elastičnega hrustanca je bil najvišji za gena kolagen I in elastin (Slika 19). Po 7 dnevnem gojenju celic v enoslojni kulturi je v skladu z našimi pričakovanji glede na vzorce biopsij prišlo do znižanja nivoja izražanja genov za kolagen II, agrekan in elastin. Glede na mediane izražanja posameznih genov se je nivo izražanja gena za kolagen II znižal za 256-krat, za agrekan 84-krat in za elastin 12,5-krat. Nasprotno je prišlo po gojenju v enoslojnih kulturah do povečanja nivoja izražanja gena za verzikan (1,7-krat) in skoraj nespremenjenega izražanja gena za kolagen I.

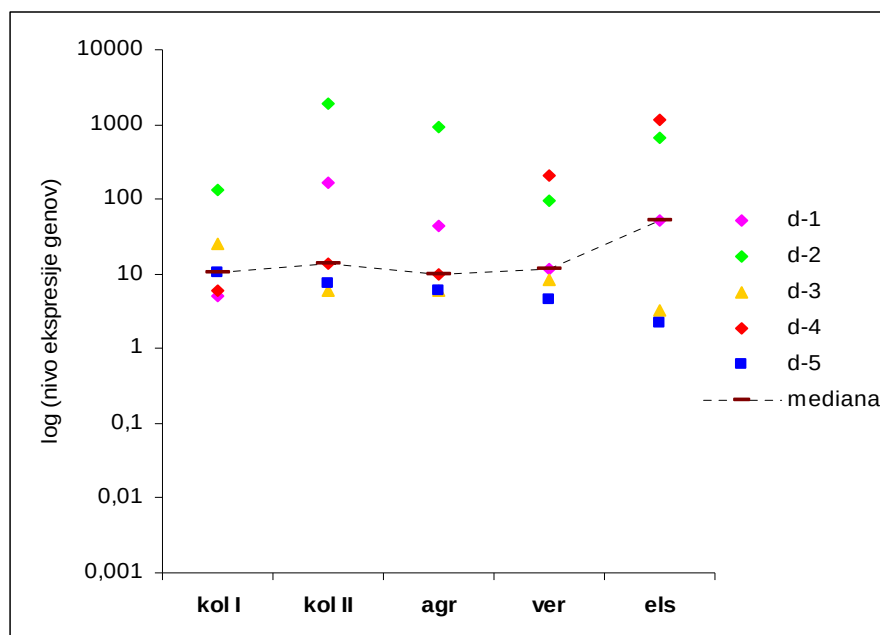
Celice gojene znotraj alginatnega hidrogela so po sedem dnevni inkubaciji skoraj obdržale nivo izražanja gena za kolagen II in agrekan. Glede na vrednosti median je bil nivo izražanja gena za kolagen II pri celicah, gojenih znotraj alginata, 250-krat višji kot pri celicah v enoslojnih kulturah, za gen agrekan pa 54-krat višji. Izražanje gena za elastin je pri celicah v tridimenzionalnih kulturah (alginatu) glede na mediano celo preseglo (za 2,2-krat) nivo izražanja celic v biopsijskih vzorcih in je bilo za 28-krat višje kot pri celicah v enosloju. V primerjavi s celicami v enosloju je bilo pri celicah tridimenzionalne kulture prav tako opazno 2,9-kratno znižanje nivoja izražanja gena za verzikan in 8-kratno znižanje za gen kolagen I.



Slika 19: Nivo izražanja genov kol II, kol I, agr, ver in els v vzorcih biopsij humanega ušesnega elastičnega hrustanca, N=5. Vrednosti median so povezane s črtkano črto.



Slika 20: Nivo izražanja genov kol II, kol I, agr, ver in els po 7-dnevnem gojenju celic humanega ušesnega elastičnega hrustanca v enoslojnih kulturah, N=5. Vrednosti median so povezane s črtkano črto.



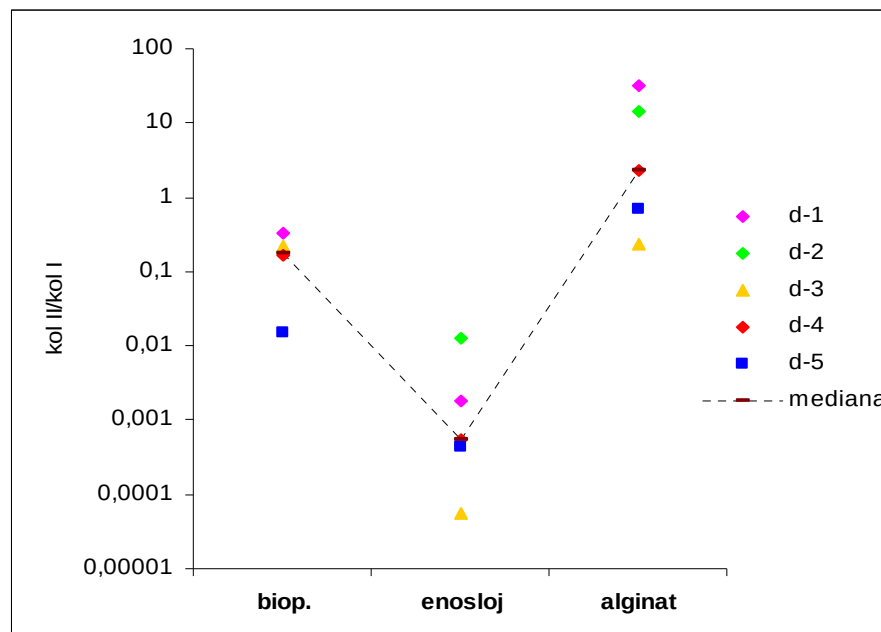
Slika 21: Nivo izražanja genov kol II, kol I, agr, ver in els po 7-dnevnem gojenju celic humanega ušesnega elastičnega hrustanca v tridimenzionalnih kulturah, N=5. Vrednosti median so povezane s črtkano črto.

	KOL I	KOL II	AGR	VER	ELS
vzorec biopsije	88.5818 [61.774-339.97]	13.9952 [2.330-65.334]	15.5713 [7.589-64.659]	20.6113 [3.742-118.921]	23.0049 [14.930-477.96]
enoslojna kultura	85.1042 [24.942-428.888]	0.0546 [0.005-0.3924]	0.1846 [0.089-1.746]	35.0116 [19.766-66.925]	1.8411 [0.483-68.847]
alginatni hidrogel	10.5553 [5.083-129.934]	13.6351 [5.855-1888.213]	9.9829 [5.874-919.526]	11.9204 [4.564-204.585]	51.0751 [3.1973-1156.02]

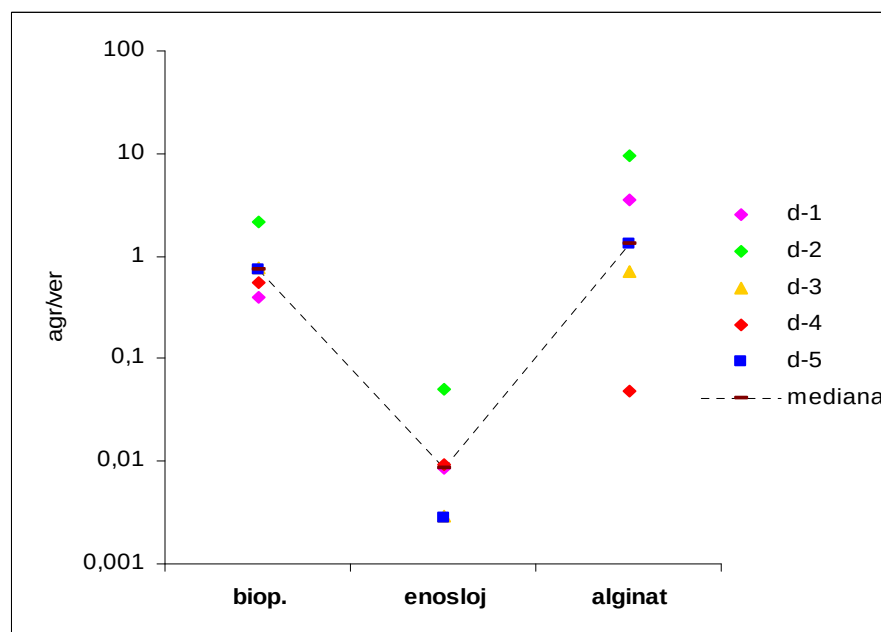
Preglednica 1: Rezultati nivoja izražanja genov celic humanega elastičnega hrustanca, ki smo jih pridobili z metodo RT-PCR. Vrednosti izražanja genov so prikazane kot mediane [min-max], N=5.

Če naše rezultate primerjamo z nivojem izražanja posameznih genov pri celicah hialinega hrustanca (Maličev in sod, 2008), ki so bile gojene pri enakih pogojih, ugotovimo, da je vzorec sprememb v izražanju izbranih genov po sedem dnevnem gojenju v enoslojni in tridimenzionalni kulturi v obeh primerih zelo podoben. Po gojenju v enoslojni kulturi je pri celicah obeh tipov hrustanca prišlo do znižanja nivoja izražanja gena za kolagen II in agrekan ter zvišanja izražanja gena za kolagen I in verzikan. Nasprotno pa so celice iz obeh virov hrustanca po sedem dnevnem gojenju znotraj alginatnega hidrogela skorajda obdržale nivo izražanja gena za kolagen II in agrekan, oziroma je bilo to znižanje dosti manjše kot v primeru enoslojnih kultur. Odstopanje v nivoju izražanja pa je opazno v primeru gena za elastin, ki je v vseh primerih pričakovano višji pri celicah elastičnega hrustanca. Ta razlika je največja med vzorci biopsij obeh virov hrustanca, medtem ko se je po gojenju v alginatnem hidrogelu in predvsem v enosloju ta razlika nekoliko zmanjšala, saj se je nivo izražanja gena za elastin pri celicah hialinega hrustanca po gojenju *in vitro* glede na vzorce biopsij presenetljivo nekoliko zvišal. Če primerjamo vzorce biopsij obeh tipov hrustanca, opazimo tudi, da pri celicah hialinega hrustanca prevladuje izražanje gena

za kolagen II, medtem ko pri celicah elastičnega hrustanca prevladuje izražanje gena za kolagen I. Slednja razlika se po gojenju znotraj alginatnega hidrogela skorajda izniči.



Slika 22: Diferenciacijski indeksi kol II/kol I, izračunani za vzorce biopsij in celice po sedem dnevnem gojenju v enoslojnih in tridimenzionalnih kulturah (alginat), N=5. Vrednosti median so povezane s črtkano črto.



Slika 23: Diferenciacijski indeksi alg/ver, izračunani za vzorce biopsij in celice po sedem dnevnem gojenju v enoslojnih in tridimenzionalnih kulturah (alginat), N=5. Vrednosti median so povezane s črtkano črto.

V primeru gojenja hialinega hrustanca se kot pokazatelj procesa dediferenciacije iz normaliziranih vrednosti nivojev izražanja genov pogosto izračunajo razmerja med kolagenom II v primerjavi s kolagenom I (kol II/kol I) ter agrekanom v primerjavi z verzikanom (agr/ver). Kot omenjeno, smo želeli rezultate izražanja izbranih genov primerjati z rezultati za hialini hrustanec in posledično ugotoviti, če bi bile celice elastičnega hrustanca, gojene *in vitro*, ustrezen vir celic za implantacijo na mesto poškodbe hialinega hrustanca, zato smo tudi mi izračunali diferenciacijske indekse za celice elastičnega hrustanca in vrednosti prikazali v dveh ločenih grafih (Slika 21 (kol II/kol I) in Slika 22 (agr/ver)).

Vrednosti diferenciacijskih indeksov kol II/kol I in agr/ver so bile po gojenju v enoslojnih kulturah precej nižje od vrednosti pri vzorcih biopsij, kar je posledica zmanjšane nivoja izražanja gena za kolagen II. Glede na mediane omenjenega indeksa se je le-ta po gojenju v enoslojnih kulturah zmanjšal za faktor 318. Obratno velja za celice, ki smo jih sedem dni gojili znotraj alginatnih hidrogelov. Diferenciacijski indeks kol II/kol I je bil v primerjavi z enoslojnimi kulturami za 4210-krat višji in je celo presegel vrednost indeksa dobljenega pri vzorcih biopsij, saj je bil nivo izražanja gena za kolagen I v primeru gojenja znotraj alginata precej nižji kot pri vzorcih biopsij. V enoslojnih kulturah se je prav tako kazal trend znižanja diferenciacijskega indeksa agr/ver glede na vzorce biopsij. Mediana indeksa agr/ver je bila pri omenjenih eksperimentalnih pogojih kot posledica znižane nivoja izražanja gena za agrekan in zvišane za verzikan nižja za faktor 85. V primeru gojenja znotraj alginatnih hidrogelov pa so bile vrednosti omenjenega indeksa podobne vrednostim vzorcev biopsij (mediani se razlikujeta za faktor 1,7). Mediana indeksa agr/ver je pri omenjenih pogojih gojenja za faktor 149 presegla mediano vrednosti indeksa pri vzorcih, gojenih v enoslojnih kulturah.

Vrednosti indeksov kol II/kol I in agr/ver po sedem dnevnem gojenju v enoslojnih in tridimenzionalnih kulturah so bile v večji meri skladne z našimi pričakovanji in so potrdile, da se pri celicah elastičnega hrustanca kaže podoben trend spreminjanja izražanja izbranih genov kot pri celicah hialinega hrustanca. Pri gojenju v enoslojnih kulturah je prišlo do upada vrednosti diferenciacijskih indeksov, kar tudi pri celicah elastičnega hrustanca kaže na proces, ki ga pri hialinem hrustancu imenujemo dediferenciacija. Nasprotno so bile vrednosti indeksov po gojenju znotraj alginatnega hidrogela visoke, kar potrjuje, da ni prišlo do izražanja genov, specifičnih za fibroblaste.

Rezultati statističnih analiz z neparametričnima testoma Fridman in Wilcoxon so prikazani v Prilogi D. Statistično pomembne razlike v nivoju izražanja posameznega gena med vzorci biopsij, enoslojnimi in tridimenzionalnimi kulturami hondrocit smo s pomočjo Wilcoxonovega testa potrdili v primeru izražanja gena za kolagen II, agrekan in elastin. Izražanje gena za kolagen II in gena za agrekan je bilo statistično signifikantno med hondrociti v enoslojnih kulturah in vzorci biopsij ($p=0,043$) ter med enoslojnimi kulturami in hondrociti, gojenimi znotraj alginatnega hidrogela ($p=0,043$). V primeru izražanja gena za elastin smo statistično signifikantno razliko dokazali le med vzorci enoslojnih in tridimenzionalnih kultur ($p=0,043$).

5 RAZPRAVA

5.1 ŠTEVILO IZOLIRANIH IN DELEŽ ŽIVIH IZOLIRANIH HONDROCIKOV: VPLIV ČASA RAZGRADNJE, RAZLIČNIH ENCIMSKIH MEDIJEV TER INKUBACIJE MED MIROVANJEM, VRTENJEM IN MEŠANJEM

5.1.1 Število izoliranih hondrocičkov

Prvi korak pri zdravljenju hrustančnih in drugih poškodb s pomočjo tkivnega inženirstva predstavlja izolacija hondrocičkov iz biopsijskega vzorca. Pomembno je, da določimo optimalne pogoje razgradnje tkiva, saj lahko le tako izoliramo zadostno število celic in zagotovimo visoko stopnjo preživetja celic ter pripravimo ustrezen in varen biološki nadomestek. Raziskovalci se trudijo skrajšati in optimizirati postopek izolacije, saj je pri uporabi hondrocičkov v klinične namene čas postopka razgradnje tkiva zelo pomemben, saj želimo izolirane celice čimprej uporabiti. Primerna razgradnja nam namreč v čim krajšem času zagotovi zadostno število živih celic za pripravo primarne kulture ali drugih celičnih pripravkov.

Hrustančno medceličnino kunčjega uhlja lahko v zadostni meri razgradimo z uporabo 0,1 % kolagenaze II, pri čemer razgradnja traja 16 do 22 ur (Fröhlich, 2004). Različni raziskovalci so za izolacijo celic hondrocičkov uporabili različne encimske mešanice, kot so kolagenaza II (Fröhlich, 2004; Tay in sod., 2004; Kregar Velikonja in sod, 2008; Asawa in sod., 2009), kolagenaza B (Bos in sod., 2006; Mandl in sod., 2002), kolagenaza P (Chia s sod., 2005), pronaza E (Bos in sod., 2006), pronaza XIV (Tran-Khanh in sod., 2005), hialuronidaza in tripsin (Park in sod., 2004; Kino-oka in sod., 2005). Prav tako raziskovalci pri poskusih navajajo različno dolg čas inkubacije v medijih za razgradnjo. V nekaterih primerih so raziskovalci izpostavili elastično hrustančno tkivo encimski razgradnji daljše časovno obdobje, ki je trajalo preko noči – od 18 do 25 ur (Madsen in sod., 1983; Gorenšek in sod., 2004, Fröhlich, 2004; Asawa in sod., 2009), nekateri pa krajše časovno obdobje – do 6 ur (Thyberg in Hinek, 1977; Yang in sod, 2000). Seveda pa je treba poudariti, da so bili poskusi izvedeni s hrustančnim tkivom različnih živali oziroma človeka.

Naš namen je bil ugotoviti kako vplivajo na število izoliranih hondrocičkov različne koncentracije kolagenaze II, ki je pogosto izbran encim za pripravo medija za razgradnjo elastičnega tkiva (Fröhlich, 2004; Tay in sod., 2004; Kregar Velikonja in sod, 2008; Asawa in sod., 2009), dodatek tripsina, čas razgradnje in inkubacija med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem in ugotoviti kateri od eksperimentalnih pogojev je najustreznejši in predvsem najučinkovitejši za izolacijo celic humanega elastičnega hrustanca.

Uporabili smo tri različne koncentracije kolagenaze II – 0,1 %, 0,3 % in 0,5 % ter mešanico 0,5 % kolagenaze II in 0,5 % tripsina. Enako število vzorcev z vsemi naštetimi encimskimi mešanicami smo inkubirali med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem. Število izoliranih celic smo spremljali po tri, šest in enaindvajset urni razgradnji. Na razpolago smo imeli omejeno količino biopsijskih vzorcev elastičnega hrustanca, saj smo poskuse

izvedli s humanim in ne živalskim tkivom, ki ga je lažje pridobiti. Zaradi omejene razpoložljivosti biopsij humanega elastičnega tkiva, ki se odvzamejo po smrti darovalcev, smo imeli v času opravljanja poskusov izolacije hondrocitov elastičnega hrustanca na razpolago biopsijske vzorce treh darovalcev, ki smo jih ustrezno razdelili in inkubirali pri različnih pogojih. V primeru encimskih mešanic z dodatkom tripsina smo pri posameznem pogoju (mirovanje, vrtenje in mešanje) inkubirali zgolj po dva vzorca, v ostalih primerih pa po tri vzorce.

V skladu z našimi pričakovanji je bilo število prešteti izoliranih celic/mg inkubiranega tkiva pri posameznem eksperimentalnem pogoju po šest urni razgradnji višje kot po treh urah. Povečanje števila izoliranih celic/mg inkubiranega tkiva po enaindvajset urni razgradnji glede na šest urno inkubacijo v mediju za razgradnjo pa je bilo manjše od naših pričakovanj. Predvidevali smo namreč, da se bo z daljšanjem izpostavitve hrustančnega tkiva encimu kolagenazi II povečeval delež razgrajenih molekul izvenceličnega matriksa in se bo sprostilo večje število hondrocitov. Seveda pa ima na aktivnost encima vpliv tudi koncentracija substrata. Z naraščajočo količino (koncentracijo) raste hitrost encimske reakcije, ki doseže maksimum pri tisti koncentraciji substrata, pri kateri so zasedeni vsi aktivni centri encima. Obratno pa so pri pomanjkanju substrata molekule encima v neaktivnem stanju (Boyer, 2005). Ker po enaindvajseturni razgradnji pri vzorcih z 0,5 % kolagenazo II in 0,5 % kolagenazo II z dodatkom tripsina nismo opazili ostankov nerazgrajenega tkiva, je možna razlaga, da je manjše število izoliranih celic od pričakovanega posledica pomanjkanja substrata, saj obstaja verjetnost, da je bilo vso inkubirano tkivo razgrajeno že pred enaindvajsetimi urami. Da bi se izognili morebitnemu vplivu pomakanja substrata oziroma inkubiranega tkiva na število izoliranih celic, bi morali uporabiti zgolj rezultate vzorcev, pri katerih bi bil po razgradnji še vedno prisoten ostanek nerazgrajenega tkiva.

Prav tako pa ima na aktivnost encimske razgradnje poleg koncentracije substrata vpliv tudi koncentracija samega encima v mediju za razgradnjo, saj višanje koncentracije encima pozitivno vpliva na hitrost encimske reakcije, seveda če predpostavimo, da je substrat prisoten v izobilju (Boyer, 2005). Z višjo koncentracijo encima povečamo število aktivnih mest na katere se lahko veže substrat in tako pride v določenem časovnem obdobju do povečanega nastanka produkta (Rastogi, 2003). Pri nižji koncentraciji encima in substratu v izobilju bi bila tako hitrost encimske reakcije nižja kot v primeru višje koncentracije encima. Seveda slednje ne velja, kakor hitro substrat ni več prisoten v izobilju. Predpostavljam, da bi v našem primeru omenjeno zviševanje hitrosti encimske reakcije potekalo le do določene koncentracije encima, saj smo v encimske mešanice namestili koščke tkiva, ki smo jih dobili po razrezu biopsijskih vzorcev s skalpelom. Pri določeni koncentraciji bi tako molekule encima povsem prekrile površino tkiva in razpoložljiv substrat. V tem primeru vsako nadaljnje zviševanje koncentracije encima ne bi imelo vpliva na večjo hitrost encimske reakcije.

Rezultati naših poskusov v večji meri potrjujejo, da lahko z višjo koncentracijo kolagenaze II v mediju za razgradnjo po enakem času inkubacije izoliramo večje število celic/mg inkubiranega tkiva. Ta razlika je bila najbolj opazna po tri in šest urni razgradnji in pri vzorcih z 0,3 % in 0,5 % kolagenazo II glede na vzorce z 0,1 % kolagenazo II. Slednje bi lahko pojasnili z dejstvom, da je bilo verjetno pri tri in šest urni inkubaciji na razpolago še

dovolj substrata za vezavo na razpoložljiva aktivna mesta encimskih molekul, medtem ko je pri dolgotrajnejši inkubaciji pri vzorcih z višjo koncentracijo kolagenaze II že prišlo do omejitve substrata.

Zanimalo nas je tudi, če tripsin, ki ga uvrščamo med serinske endopeptidaze in cepi različne peptidne vezi (Rawlings in Barrett, 1994) pospeši razgradnjo izvenceličnega matriksa in s tem povezano izolacijo celic elastičnega hrustanca. Kljub temu, da nekateri raziskovalci v svojih člankih navajajo kratkotrajnejšo inkubacijo hrustančnega tkiva v encimski mešanici s tripsinom za namen izolacije hondrocitov (Park in sod., 2004; Kino-oka in sod., 2005), pa mi glede na rezultate ne moremo potrditi, da ima dodatek tripsina učinek na povečano število izoliranih celic/mg inkubiranega tkiva. Število izoliranih celic pri vzorcih z 0,5 % kolagenazo II in dodatkom tripsina namreč v večini primerov ni preseglo števila prešteti izoliranih celic pri vzorcih z 0,5 % kolagenazo II brez tripsina. Pri tem pa je potrebno še upoštevati, da ima dolgotrajnejša izpostavitve tkiva encimski mešanici s tripsinom, pogosto za posledico povečano število mrtvih in poškodovanih celic (Baines, 1994; Freshney 1994, Picot in sod., 2005), kar je še dodaten razlog, da se pred uporabo tripsina prepričamo, ali je njegova uporaba smotna.

Ker gre za biološke vzorce pa imajo na uspešnost izolacije vpliv še nekateri drugi faktorji, ki jih ni mogoče v celoti določiti in nadzorovati. Eden od teh faktorjev je starost hrustančnega tkiva, saj nekateri raziskovalci navajajo, da je encimska razgradnja s kolagenazo učinkovitejša pri mladem hrustančnem tkivu (Malejczyk in Moskalewski, 1988; Fröhlich, 2004) manj pa pri starejšem (Madsen in sod., 1983; Fröhlich, 2004). Prav tako naj bi bile celice starejših tkiv bolj občutljive na razgradnjo s tripsinom kot mlado hrustančno tkivo in zarodne celice (Picot in sod., 2005).

Predpostavili smo, da bi lahko z inkubacijo vzorcev med vrtenjem oziroma mešanjem encimskega medija z magnetnim mešalom pospešili proces izolacije hondrocitov. Kljub večjemu številu izoliranih celic pri šest in enaindvajset urni razgradnji v mediju z 0,5 % kolagenazo med vrtenjem v primerjavi z enaindvajset urno razgradnjo tkiva med mirovanjem v mediju z 0,5 % kolagenazo, ne moremo potrditi, da lahko z vrtenjem vzorcev pospešimo oziroma povišamo število izoliranih celic/mg inkubiranega tkiva, saj bi za to morali izvesti dodatne poskuse z večjim številom vzorcev. Primerjava rezultatov med vzorci inkubiranimi med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem s Fridmanovim testom ($p < 0,05$) ni pokazala statistično signifikantnih razlik med vrednostmi.

Potrebno je poudariti, da zaradi majhnega števila vzorcev na podlagi rezultatov ne moremo z zagotovostjo potrditi oziroma zavreči naših domnev, saj le-ti niso reprezentativni. Slednje trditve potrjujejo velike standardne deviacije, ki kažejo tudi na veliko biološko spremenljivost vzorcev. Poleg naštetega pa moramo upoštevati še morebitne napake, ki se pojavljajo pri štetju obarvanih celic s hemocitometrom. Nezanesljivost metode se je pokazala tudi v našem primeru, saj je bilo kar pri nekaj vzorcih prešteto število izoliranih celic/mg inkubiranega tkiva po enaindvajset urni razgradnji manjše kot po šest urni razgradnji pri enakih pogojih, kar lahko pripišemo zgolj napakam pri štetju celic s hemocitometrom. Kljub naštetemu pa lahko zaključimo, da bi bilo v prihodnje smotno nadaljevati s poskusi uspešnosti izolacije hondrocitov po šest urni razgradnji tkiva v encimskem mediju z 0,3 % in 0,5 % kolagenazo II med mirovanjem in vrtenjem.

5.1.2 Delež živih izoliranih hondrocitov

Če želimo optimizirati postopek razgradnje humanega elastičnega tkiva je pomembno, da poleg števila izoliranih celic pri posameznih pogojih razgradnje spremljamo tudi odstotek živih celic. Kot ustrezne za uporabo v klinične namene lahko označimo tiste pogoje, ki nam zagotovijo potrebno število celic za nadaljnje aplikacije in hkrati ohranijo visok delež živih celic. Če primerjamo izolacijo, tripsinizacijo primarne kulture in naslednjih pasaž, je najnižji odstotek živih celic pričakovan ravno pri izolaciji, saj so celice izpostavljene kar velikemu selekcijskemu pritisku. Raziskovalci se vseskozi trudijo, da bi bil ta pritisk in posledična izguba celic čim manjša.

Odstotke živih celic pri vzorcih s posamezno encimsko mešanico (0,1 %, 0,3 % in 0,5 % kolagenazo II in mešanico 0,5 % kolagenaze II in 0,5 % tripsina), ki smo jih inkubirali med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem, smo spremljali po tri, šest in enaindvajset urni razgradnji. Žive in mrtve celice smo prešteli s pomočjo metode barvanja s tripanskim modrilom in opazovanjem pod svetlobnim mikroskopom.

Glede na tip tkiva iz katerega želimo izolirati celice, moramo izbrati koncentracijo encima v mediju za razgradnjo in ustrezen čas razgradnje. Razgradnja v encimskem mediju s prenizko koncentracijo encima kolagenaze ali prekratek čas inkubacije bi imela za posledico nezadostno razgrajen izvenselični matriks in premajhno število izoliranih celic. Razgradnja v encimskih mešanicah z višjo koncentracijo kolagenaze in dolgotrajnejša izpostavitve elastičnega hrustanca encimu kolagenazi pa naj bi zmanjšala delež živih izoliranih celic (Saadeh in sod., 1999; Yang in sod., 2000; Kim in sod., 2001). Optimizirati razgradnjo tako pomeni najti ustrezno koncentracijo kolagenaze in čas trajanja razgradnje, ki bosta omogočala izolacijo zadostnega števila celic in visok delež živih celic.

V našem primeru nismo ugotovili korelacije med trajanjem razgradnje in deležem živih celic, saj med odstotki živih celic pri posameznih eksperimentalnih pogojih po tri, šest in enaindvajset urni razgradnji ni bilo večjih odstopanj. Podobno velja tudi za inkubacijo v encimskem mediju z različno koncentracijo kolagenaze II, saj nismo opazili zmanjšanja odstotka živih celic pri vzorcih z 0,3 % in 0,5 % kolagenazo glede na vzorce z 0,1 % kolagenazo. Vzrok za omenjene rezultate je lahko v majhnem številu vzorcev in njihovi veliki biološki spremenljivosti. Upoštevati moramo tudi, da je lahko prišlo pri štetju in določevanju živih in mrtvih celic s hemocitometrom in tripanskim modrilom do napak, ki so pomembno vplivale na vrednosti rezultatov.

Najnižje vrednosti odstotka živih celic med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem so bile opažene pri vzorcih, ki so v encimski mešanici vsebovali dodatek tripsina, kar se sklada z našimi pričakovanji. Dolgotrajnejša izpostavitve tkiva tripsinu je namreč za celice škodljiva in poveča delež poškodovanih in mrtvih celic (Baines, 1994; Freshney 1994, Picot in sod., 2005). V tkivnem inženirstvu se tripsin uporablja za ločitev hondrocitov od dna gojilne posode, da dobimo celično suspenzijo in celice nasadimo v naslednjo pasažo, vendar je izpostavitve tripsinu kratkotrajna in traja največ 10 minut. Tako lahko povzamemo, da če se odločimo za razgradnjo elastičnega hrustanca v encimskem mediju, ki vsebuje tripsin, mora biti le-ta kratkotrajna. Nekateri avtorji navajajo, da lahko celice

mlajših tkiv inkubiramo dlje časa, saj naj bi bile manj občutljive na tripsin kot celice starejših tkiv (Picot in sod., 2005).

Spremljali in primerjali smo tudi odstotke živih celic v vzorcih, ki smo jih inkubirali med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem. Mešanje encimske mešanice z magnetnim mešalom bi lahko poškodovalo celice, kar bi se pokazalo v manjšem odstotku živih izoliranih celic. Pri večini vzorcev smo opazili nekoliko znižan odstotek živih izoliranih celic, vendar zaradi majhnega števila vzorcev, velikih standardnih deviacij in nezanesljivosti metode štetja živih in mrtvih celic s hemocitometrom ne moremo sklepati, da ima inkubacija med mešanjem vpliv na večji delež mrtvih izoliranih celic. Prav tako Friedmanov test ($p < 0,05$) ni pokazal, da bi bile razlike med vzorci med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem statistično pomembne.

5.2 FENOTIPSKE LASTNOSTI CELIC ELASTIČNEGA HRUSTANCA, GOJENIH V ENOSLOJNI IN TRIDIMENZIONALNI KULTURI

Metoda implantacije avtolognih hondrocitov, ki je tudi v Sloveniji del redne klinične prakse in se uporablja za zdravljenje poškodb sklepnega hrustanca, se je izkazala za uspešno, vendar pa ima le-ta tudi svoje slabosti, ki jih raziskovalci do danes še niso uspeli razrešiti. Te slabosti so predvsem: omejena proliferacija hondrocitov, problem dediferenciacije celic, poškodbe, ki lahko nastanejo kot posledica odvzema biopsije iz sklepa in zapoznena implantacija pripravkov zaradi potrebnega časa gojenja (Brittberg in sod., 1994; Sitterling in sod., 2004; Marlovits in Trattning, 2006; Mayer in sod., 2009). Vse naštetu bi lahko rešili, če bi imeli na razpolago zadosten vir celic, ki bi nam omogočal neposredno nasaditev celic na ustrezen tridimenzionalen nosilec. Raziskovalci so že poskusili z uporabo pripravkov iz bolniku tujih homolognih celic, vendar s tem tvegamo prenos nekaterih bolezni. Alternativno možnost nam morda ponujajo zarodne celice, vendar so z njimi povezane raziskave šele v začetni fazi (Gao in sod., 2007). Prav tako se v povezavi z uporabo zarodnih celic porajajo nekatera etična vprašanja. Pomembno vprašanje v diplomski nalogi je, ali bi lahko uporabili avtologne celice elastičnega hrustanca kot vir celic za zdravljenje poškodb hialinega hrustanca.

Elastični hrustanec je vse pogostejše uporabljeno tkivo v tkivno-inženirskih aplikacijah, saj kaže potencial za uporabo na različnih področjih medicine. Njegova prednost pred hialinim hrustancem je predvsem ta, da lahko potrebno tkivno biopsijo pridobimo z nezahtevnim in kratkotrajnim posegom s hitrejšo rehabilitacijo. Slabost pa je, da imamo v primerjavi s celicami sklepnega hrustanca manj podatkov o gojenju celic elastičnega hrustanca, predvsem v tridimenzionalnem okolju. Večina razpoložljivih podatkov je bila namreč pridobljena s poskusi na živalih (Fröhlich, 2004; Gorenšek in sod., 2004; Westreich in sod., 2004). Ker ne moremo z zagotovostjo trditi in posplošiti, da ugotovitve pridobljene s poskusi na živalih veljajo tudi za človeška tkiva, smo se odločili, da bomo za poskuse izražanja genov uporabili biopsijske vzorce humanega elastičnega hrustanca.

Pri uporabi tkivno-inženirskih pripravkov iz hondrocitov v klinične namene je živost in izražanje izbranih genov, ki kodirajo komponente izvenceličnega matriksa, izrednega pomena, saj je od fenotipa celic, ki jih vnesemo na mesto poškodbe hrustanca, odvisna uspešnost zdravljenja (Adolphe in sod., 1992). Raziskovalci so ugotovili, da hondrociti sklepnega hrustanca v tridimenzionalnem okolju *in vitro* ohranjajo fenotipske lastnosti (Dušanić, 2007; Barlič in Maličev, 2008). Če bi želeli kot vir celic za zdravljenje poškodb hialinega hrustanca uporabiti elastični humani hrustanec, bi se morali pred tem prepričati, da so te celice v določenem okolju sposobne proizvajati matriks, ki je značilen za hialino hrustančno tkivo. Zato nas je v diplomski nalogi zanimalo, ali bi se tudi hondrociti elastičnega hrustanca, ki v naravnem okolju tvorijo matriks z drugačnim razmerjem proteinov, pod istimi pogoji obnašali podobno kot hondrociti hialinega hrustanca. Povedano drugače, zanimalo nas je, ali bo prišlo do povišanega izražanja gena za kol II in agr ter zmanjšanega izražanja gena za kol I, ver in els.

Fenotipske lastnosti hondrocitov elastičnega hrustanca, gojenih v tridimenzionalnih nosilcih iz alginatnega hidrogela in enoslojnih kulturah, smo spremljali po sedmih dneh gojenja. Za zgolj enotedensko gojenje v izbranih eksperimentalnih pogojih smo se odločili,

ker je cilj raziskovalcev čim prej pripraviti ustrezen pripravek iz hondrocitov in ga implantirati v bolnika. Zato smo nivo izražanja genov, specifičnih za hrustančno tkivo, analizirali po najkrajšem možnem času gojenja. Prav tako so v nekaterih prejšnjih raziskavah že ugotavljali vpliv dva do šest tedenskega gojenja celic znotraj alginatnih hidrogelov na fenotipske lastnosti hrustančnih celic. (Bonaventure, 1994; Zheng in sod., 2007; Barlič in sod., 2008).

Fenotipske lastnosti hrustančnih celic po gojenju v enoslojnih in tridimenzionalnih kulturah smo določili s pomočjo opazovanja oblike celic pod invertnim mikroskopom, saj vemo, da je sprememba kroglaste v vretenasto fibroblastno obliko eden prvih pokazateljev dediferenciacije hondrocitov. Slednji izraz se pogosto uporablja za opis sprememb v izražanju genov pri celicah hialinega hrustanca, ki so bile gojene v enoslojni kulturi. Pri omenjenem procesu pride do zmanjšanja izražanja genov, specifičnih za hialini hrustanec, (kol II in agr) ter povečanega izražanja genov, specifičnih za fibrozni tip hrustančnega tkiva (kol I in ver). Vemo namreč, da se hondrociti po izolaciji in gojenju *in vitro* zelo radi dediferencirajo v fibroblaste, kar pomeni, da postopoma spremenijo svoje fenotipske lastnosti in postanejo na videz podobni fibroblastom (Mayer in sod., 2009). Tudi nas je zanimalo izražanje omenjenih genov matriksa pri *in vitro* gojenih celicah elastičnega hrustanca, zato smo izražanje genov na nivoju mRNA določili z metodo RT-PCR.

V primeru gojenja hialinega hrustanca se iz normaliziranih vrednosti nivojev izražanja genov pogosto izračunajo diferenciacijski indeksi, ki so pokazatelj razmerja med številom mRNA molekul za kolagen II v primerjavi s kolagenom I (kol II/kol I) ter agrekana v primerjavi z verzikanom (agr/ver). Kolagen II in agrekan sta namreč tipična markerja za diferencirane hondroците, kolagen I in verzikan pa za dediferencirane. Višje vrednosti diferenciacijskih indeksov so tako pokazatelj, da je izražanje genov bolj podobno hondroцитom, medtem ko nižje vrednosti kažejo na izražanje genov, ki je bolj podobno fibroblastom (Martin in sod., 2001). Ker je bil namen naloge ugotoviti, če je elastični hrustanec primeren vir celic za popravilo poškodb hialinega sklepnega hrustanca, smo tudi v našem primeru za celice elastičnega hrustanca izračunali omenjene indekse in dobljene vrednosti primerjali z vrednostmi hialinega hrustanca.

Rezultati naših poskusov potrjujejo, da je v primeru sedem dnevnega gojenja celic v enoslojnih kulturah prišlo do sprememb v izražanju izbranih genov, ki so tako rekoč skoraj identične procesu dediferenciacije, opaženem pri hialinem hrustancu (Maličev in sod, 2008). V vzorcih biopsij je bil nivo ekspresije najvišji za gena kolagen I in elastin. Visok nivo izražanja gena za kolagena I lahko delno razložimo z dejstvom, da vsebuje elastični hrustanec v izvenceličnem matriksu veliko več kolagena I kot hialini hrustanec. V skladu z našimi pričakovanji pa je prevladovalo tudi izražanje gena za elastin, saj daje le-ta elastičnemu hrustancu elastičnost in prožnost (Mithieux in Weiss, 2005). Med gojenjem v enoslojni kulturi so hondrociti spremenili obliko iz okrogle v vretenasto (Slika 17), kar kaže na spremembo fenotipa gojenih celic. Slednje so že dokazali v številnih poskusih na hialinem hrustancu (Fröhlich, 2004; Dušanić, 2007). Skladno s spremembami oblike je v našem primeru po gojenju celic v enoslojnih kulturah glede na vzorce biopsij prišlo do znižanja nivoja izražanja genov za kolagen II (256-krat), agrekan (84 krat) in elastin (12,5 krat). Slednje, z izjemo gena za elastin, se sklada z vzorcem sprememb fenotipa celic hialinega hrustanca, ki so bile gojene pri enakih pogojih (Maličev in sod, 2008). Nasprotno

je prišlo po gojenju v enoslojnih kulturah do povečanja nivoja izražanja gena za verzikan (1,7-krat) in skoraj nespremenjenega izražanja gena za kolagen I. Posledično so se znižale tudi vrednosti dediferencijskih indeksov kol II/kol I in agr/ver, glede na vrednosti v vzorcih biopsij, kar ponovno dokazuje visoko stopnjo izgube hrustančnega fenotipa. Prav tako elastični hrustanec, gojen v enoslojnih kulturah izgubi zanj značilno elastičnost in prožnost, saj se zmanjša ekspresija gena za elastin.

Nasprotno pa pri celicah, gojenih znotraj alginatnega hidrogela, ki smo jih opazovali z invertnim mikroskopom, nismo opazili spremembe v vretenasto fibroblastno obliko (Slika 18). Rezultati analize genov so potrdili, da so se celice po sedem dnevnem gojenju znotraj alginatnih hidrogelov obnašale podobno kot hialini hondrociti. Povečale so izražanje gena za kol II in agr ter zmanjšale izražanje kol I, glede na biopsijske vzorce elastičnega hrustanca. Glede na ekspresijo hondrocitov, gojenih v enoslojnih kulturah, je bil v tem primeru veliko višji nivo izražanja gena za kolagen II (250-krat), za agrekan (54-krat) in za elastin (28-krat). Obratno pa je bilo v primerjavi s celicami v enosloju opazno znižanje nivoja izražanja gena za verzikan (2,9-krat) in kolagen I (8-krat). Izražanje genov, podobno hondroцитom, še dodatno potrjuje visoki vrednosti dediferencijskih indeksov kol II/kol I in agr/ver. Očitno je, da predstavlja alginatni hidrogel veliko ustrežnejše okolje za gojenje celic elastičnega hrustanca kot enoslojna kultura, saj omogoča celicam rast v treh dimenzijah prostora (Fedorovich, 2006), s čimer se približamo naravnemu okolju v tkivu. Hkrati so celice, ki jih pridobimo z gojenjem v tridimenzionalni kulturi, zaradi manj spremenjenega fenotipa, veliko bolj uporabne v klinične namene. Z gojenjem tridimenzionalnih kultur v ustreznem bioreaktorju pa bi lahko morda še dodatno pripomogli k ohranitvi fenotipa, specifičnega za hrustanec (Marlovits in sod., 2003).

Relativno visok nivo izražanja gena za elastin po enotedenskem gojenju kaže na to, da so celice elastičnega hrustanca sposobne obdržati del svojih lastnosti po kratkotrajnem gojenju *in vitro*. Kot vemo, imata hialini in elastični hrustanec različne biomehanske lastnosti, ki so posledica različnih komponent izvenceličnega matriksa. Kolagenska vlakna dajejo hrustancu natezno trdnost in strukturno obliko, elastin, ki ga najdemo v matriksu elastičnega hrustanca, pa elastičnost in prožnost (Marlovits in sod., 2003). Glede na omenjene razlike, pa imata oba tipa hrustanca tudi specifično funkcijo v našem telesu. V primeru implantacije celic elastičnega hrustanca na mesto poškodbe hialinega hrustanca bi morda lahko prišlo do pojava povečane vsebnosti elastina v izvenceličnem matriksu, kar bi imelo za posledico manjšo odpornost novo nastalega tkiva na pritiske in obremenitve.

Na podlagi naših rezultatov, ki so pokazali, da hondrociti elastičnega hrustanca, gojeni v alginatu, izražajo podoben fenotip kot hondrociti iz hialinega hrustanca z izjemo elastina, ki se obnavlja, lahko sklepamo, da je elastični hrustanec obetaven vir celic za implantacijo na mesta poškodb hialinega hrustanca. Seveda moramo upoštevati, da smo spremljali fenotipske lastnosti celic elastičnega hrustanca na vzorcih petih darovalcev, saj smo imeli v času opravljanja poskusov na razpolago zgolj omejeno število biopsij humanega elastičnega tkiva. Kljub majhnemu številu vzorcev pa smo glavne ugotovitve tudi statistično potrdili z neparametričnima statističnima testoma (Fridmanov in Wilcoxonov test). V prihodnjih raziskavah bomo morali zajeti čim večje število vzorcev in nadaljevati z analizami fenotipskih in biomehanskih lastnosti celic elastičnega hrustanca, gojenih *in*

vitro. Hkrati bomo morali na živalskih modelih spremljati fenotip, funkcionalnost in biomehanične lastnosti tkiva po njegovi implantaciji na mesto poškodbe.

5.3 SKLEPI

- Pri postopku izolacije hondrocitov smo spremljali vpliv različnih encimskih medijev (0,1 %, 0,3 %, 0,5% kolagenaze II ter mešanice 0,5 % kolagenaze II in 0,5 % tripsina), časa razgradnje ter inkubacije med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem na število izoliranih celic. Sklepamo lahko, da čas razgradnje vpliva na število izoliranih celic. Razlika v številu izoliranih celic je bila opazna predvsem po šesturni razgradnji v primerjavi s tri urno.
- Rezultati v večji meri potrjujejo, da z višjo koncentracijo kolagenaze II v mediju za razgradnjo po enakem času inkubacije izoliramo večje število celic. Ta razlika v številu izoliranih celic je bila v večini primerov najbolj opazna po tri in šesturni razgradnji.
- Nismo ugotovili, da bi imel dodatek tripsina v medij za razgradnjo z 0,5 % kolagenazo II vpliv na povečano število izoliranih celic.
- Glede na rezultate ne moremo potrditi, da lahko z vrtenjem vzorcev ali mešanjem encimskega medija z magnetnim mešalom pospešimo oziroma povišamo število izoliranih celic, saj primerjava rezultatov vzorcev inkubiranih med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem ni pokazala statistično signifikantnih razlik med vrednostmi.
- Odstotek živih izoliranih celic smo po treh, šestih in enaindvajsetih urah razgradnje pri posameznem eksperimentalnem pogoju določili z metodo barvanja s tripsanskim modrilom. Najnižji odstotki živih celic med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem so bili izolirani v vzorcih, ki so v encimski mešanici poleg kolagenaze II vsebovali še dodatek tripsina.
- Nismo ugotovili korelacije med trajanjem razgradnje in deležem živih celic, saj med odstotki živih celic pri posameznih eksperimentalnih pogojih po tri, šest in enaindvajset urni razgradnji ni bilo večjih odstopanj. Podobno velja tudi za inkubacijo v encimskem mediju z različno koncentracijo kolagenaze II, saj nismo opazili zmanjšanja odstotka živih celic v vzorcih z 0,3 % in 0,5 % kolagenazo glede na vzorce z 0,1 % kolagenazo.
- Statistično signifikantnih razlik med odstotki živih izoliranih celic med vzorci inkubiranimi med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem nismo dokazali.
- Z analizo izražanja genov, specifičnih za hrustanec oziroma fibrozno tkivo, smo dokazali, da je v primeru sedem dnevnega gojenja celic elastičnega hrustanca v enoslojni kulturi prišlo do sprememb v izražanju izbranih genov, ki kodirajo komponente izvenceličnega matriksa, ki so bile skoraj identične procesu dediferenciacije pri hialinem hrustancu.
- Opazovanje celic elastičnega hrustanca pod invertnim mikroskopom je pokazalo, da hondrociti gojeni v enoslojni kulturi izgubijo značilno kroglasto obliko in preidejo v vretenasto obliko, medtem ko celice, gojene v alginatu, obdržijo kroglasto obliko.

- Rezultati analize so potrdili, da hondrociti elastičnega hrustanca gojeni v alginatu izražajo podoben fenotip kot hondrociti iz hialinega hrustanca (visoka vsebnost kol II in agr ter nizka vsebnost kol I in ver v izvenceličnem matriksu) z izjemo elastina, ki se obnavlja.
- Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da je elastični hrustanec obetaven vir celic za implantacijo na mesta poškodb hialinega hrustanca.
- Da bi lahko potrdili, da je implantacija celic elastičnega hrustanca primerna za zdravljenje poškodb hialinega hrustanca, bo v prihodnjih raziskavah potrebno nadaljevati z analizami fenotipskih in biomehaničnih lastnosti celic elastičnega hrustanca, gojenih *in vitro*. V naslednjem koraku pa bo treba na živalskih modelih spremljati fenotip, funkcionalnost in biomehanične lastnosti tkiva po njegovi implantaciji na mesto poškodbe.

6 POVZETEK

V prvem delu diplomske naloge smo želeli skrajšati in optimizirati postopek izolacije celic elastičnega hrustanca, pridobljenega iz človeškega uhlja. Hrustanec biopsijskih vzorcev treh darovalcev smo namestili v različne encimske medije z 0,1 %, 0,3 %, 0,5 % kolagenazo II in mešanico 0,5 % kolagenaze II in 0,5 % tripsina in tkivo inkubirali pri mirovanju, vrtenju in mešanju. Po treh, šestih in enaindvajsetih urah razgradnje smo s pomočjo štetja celic s tripanskim modrilom določili število in odstotek živih izoliranih celic. Število izoliranih celic se je v večini primerov povečevalo v odvisnosti od časa razgradnje in koncentracije kolagenaze II v encimskem mediju. Dodatek tripsina v medij za razgradnjo ni imel opaznega vpliva na povečanje števila izoliranih celic, opazen pa je bil manjši delež živih izoliranih celic. Predpostavko, da bi lahko z inkubacijo vzorcev pri vrtenju oziroma mešanju encimskega medija z magnetnim mešalom pospešili proces izolacije hondrocit, glede na rezultate nismo potrdili. Tudi primerjava rezultatov med vzorci inkubiranimi med mirovanjem, vrtenjem in mešanjem s Fridmanovim testom ni pokazala statistično signifikantnih razlik v številu in deležu živih izoliranih celic. Vpliv časa razgradnje in koncentracije kolagenaze II na delež živih izoliranih celic ni bil opazen.

V drugem delu diplomske naloge smo želeli izvedeti, ali je humani elastični hrustanec primeren alternativen vir celic za implantacijo na mesta poškodb hialinega sklepnega hrustanca. Hondrocite smo izolirali iz ušesnih biopsijskih vzorcev petih darovalcev. Po sedem dnevnem gojenju v enosloju in alginatnem hidrogelu smo z metodo RT-PCR določili izražanje izbranih genov, ki kodirajo komponente izvenceličnega matriksa (kol II, kol I, agr, ver in els) ter rezultate primerjali s podatki o izražanju omenjenih genov pri *in vitro* gojenih celicah hialinega sklepnega hrustanca. Prav tako smo z opazovanjem pod invertnim mikroskopom spremljali spremembo v obliki hondrocitov. Hondrociti gojeni v enoslojni kulturi so izgubili značilno kroglasto obliko in prešli v vretenasto obliko, medtem ko so celice, gojene v alginatu, obdržale kroglasto obliko, kar kaže na spremembo fenotipa celic v enoslojni kulturi. V vzorcih biopsij je bil nivo ekspresije najvišji za gena kol I in els, pričakovano pa je prišlo po gojenju v enosloju do znižanja ekspresije gena za kol II in agr, kar pri gojenju hialinega hrustanca poznamo kot proces dediferenciacije. Nasprotno pa pri celicah, gojenih znotraj alginatnega hidrogela, ni prišlo do porasta izražanja izbranih genov, specifičnih za fibrozno tkivo. Prav tako je bil nivo ekspresije za gene kol I, kol II, agr in ver primerljiv s podatki za hialini hrustanec, z izjemo gena za els, katerega ekspresija je bila pri celicah elastičnega hrustanca v vseh primerih višja. Izražanje genov smo izrazili tudi v obliki diferenciacijskih indeksov kol II/kol I in agr/ver, ki se v primeru gojenja hialinega hrustanca pogosto uporabljajo kot pokazatelji procesa diferenciacije. V enoslojnih kulturah se je kazal trend znižanja vrednosti omenjenih indeksov, medtem ko so bile vrednosti v primeru gojenja znotraj alginatnih hidrogelov podobne tistim pri celicah hialinega hrustanca. Glede na rezultate izražanja genov lahko sklepamo, da imajo celice elastičnega hrustanca po kratkotrajnem gojenju v tridimenzionalni kulturi potencial za popravilo poškodb hialinega sklepnega hrustanca, saj se je fenotip celic elastičnega hrustanca, ki smo jih gojili znotraj alginatnega hidrogela, močno približal fenotipu celic hialinega hrustanca. Za dokončno potrditev slednjega, pa bo v prihodnje potrebno nadaljevati z raziskavami.

7 VIRI

Adolphe M. 1992. Biological Regulation of the Chondrocytes. Florida, CRC Press: 352 str.

Alberts B., Wilson J., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. 2008. Molecular Biology of the Cell. 5th edition. New York, London, Garland Science: 1601 str.

Asawa Y., Ogasawara T., Takahashi T., Yamaoka H., Nishizawa S., Matsudaira K., Mori Y., Takato T., Hoshi K. 2009. Aptitude of Auricular and Nasoseptal Chondrocytes Cultured Under a Monolayer or Three-Dimensional Condition for Cartilage Tissue Engineering. Tissue Engineering Part A, 15, 5: 1109-1118.

Atala A., Cima L. G., Kim W., Paige K. T., Vacanti J. P., Retik A. B., Vacanti C. A. 1993. Injectable alginate seeded with chondrocytes as a potential treatment for vesicoureteral reflux. The Journal of Urology, 150:745-747.

Baines D., Brownwright A., Swartz J. L. 1994. Establishment of primary and continuous cultures of midgut epithelial cells of the spruce budworm, gypsy moth and silkworm. Journal of Insect Physiology, 40: 347-357.

Barlič A., Drobnič M., Maličev E., Kregar-Velikonja N. 2008. Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes assigned for autologous implantation. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 26, 6: 847-53.

Barlič A., Maličev E. 2008. Zdravljenje poškodovanega sklepnega hrustanca. Zdravniški vestnik, 77: 141-4.

Bassleer C., Gysen P., Foidart J. M., Bassleer R., Franchimont P. 1986. Human chondrocytes in tridimensional culture. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 22: 113-119.

Benya, P. D., and Shaffer, J. D. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell, 30: 215-224.

Bergman R. A., Afifi A. K., Heidger P. M. 2002. Atlas of Microscopic Anatomy: Section 3 - Connective Tissue (jul. 2002). <http://www.anatomyatlases.org> (18. jun. 2009).

Bezkorovainy A., Rafelson M. E. 1996. Concise Biochemistry: International Edition. Florida, CRC Press: 636 str.

Bonaventure J., Kadhon N., Cohen-Solal L., Ng K. H., Bourguignon J., Lasselin C., Freisinger P. 1994. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Experimental Cell Research, 212, 1: 97-104.

Bos P. K. , Verhaar J. A. N., van Osch G. J. V. M. 2006. Age-related differences in articular cartilage wound healing: a potential role for transforming growth factor beta1 in adult cartilage repair. *Advances in experimental medicine and biology*, 585: 297-309.

Bošnjak D. 2007. Tkivno inženirstvo v Sloveniji: intervju z dr. Velikonja N.K. Delo, priloga Znanost, 30. avgust 2007.

Boyer, R. F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.

Brinckmann J., Notbohm H., Müller P.K. 2005. Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly. New York, Springer: 252 str.

Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O., Peterson L. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 331: 889–95.

Bronzino J. D. 2000. The biomedical engineering handbook. 2nd edition. Florida, CRC Press: 1656 str.

Bucci L. 1995. Nutrition Applied to Injury Rehabilitation and Sports Medicine.: 284 str.

Buckwalter J. A. 1997. Were the Hunter brothers wrong? Can surgical treatment repair articular cartilage. *The Iowa Orthopaedic Journal*, 17: 1–13.

Buckwalter J. A., Mankin H. J. 1997. Articular cartilage I. Tissue design and hondrocyte-matrix interactions. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 79A, 4: 600–611.

Buckwalter J. A., Mankin H. J. 1998. Articular cartilage II. Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 79A: 612–32.

Caplan A. I. 1984. Cartilage. *Scientific American*, 251, 4: 84-7, 90-4.

Carsons S., Horn V. J. 1988. Chondronectin in human synovial fluid. *Annals of the rheumatic diseases*, 47, 10: 797-800.

Casey T. M., Arthur P. G. 2000. Hibernation in Noncontracting Mammalian Cardiomyocytes. *Circulation*, 102: 3124-3129.

Champe P. C., Harvey R. A., Ferrier D. R. 2007. Biochemistry: Biochemistry. 4th edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 520 str.

Chang J. and Poole C. A. 1996. Sequestration of type VI collagen in the pericellular microenvironment of adult chondrocytes cultured in agarose. *Osteoarthritis and Cartilage*, 4, 4: 275-285.

Chen F.S., Frenkel S.R., DiCesare P.E. 1999. Repair of articular cartilage defects. Part II. Treatment options. *American Journal of Orthopedics*, 28: 88–96.

Chia S., Homicz M., Schumacher B., Thonar E., Masuda K., Sah R., Watson D. 2005. Characterization of Human Nasal Septal Chondrocytes Cultured in Alginate. *Journal of the American College of Surgeons*, 200, 5: 691-704.

Cormack H. D. 2001. *Essential Histology*. 2nd edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 463 str.

den Boer N. C. 1989. *Clinical Chemistry: An Overview*. New York, Plenum Press: 859 str.

Dieffenbach C. W., Dveksler G. S. 2003. *PCR Primer: A Laboratory Manual*. 2nd edition. New York, Cold Spring Harbor laboratory press: 520 str.

Dozin B., Malpeli M., Camardella L., Cancedda R., Pietrangelo, A. 2002. Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines. *Molecular and cellular aspects*, 21: 449-459.

Dušanić D. 2007. Spremljanje fenotipskih lastnosti človeških hrustančnih celic med gojenjem v alginat/agaroznem gelu: diplomska naloga: univerzitetni študij. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 52 str.

Espy M. J., Uhl J. R., Sloan L. M., Buckwalter S. P., Jones M. F., Vetter E. A. 2006. Real Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 1: 165-256.

Fedorovich N. E, Alblas J., de Wijn J.R., Hennink W. E., Verbout A. J., Dhert W. J. A. 2007. Hydrogels as Extracellular Matrices for Skeletal Tissue Engineering: State-of-the-Art and Novel Application in Organ Printing. *Tissue Engineering*, 13, 8: 1905-1925.

Fennell J. P., Baker A. H. 2005. *Hypertension: methods and protocols*. Totowa, Humana Press: 501 str.

Fröhlich, Mirjam. Analiza rasti kunčjega elastičnega hrustanca v celičnih kulturah : diplomska naloga : univerzitetni študij. Ljubljana: 56 str.

Gao J., Yao J. Q., Caplan A. I. 2007. Stem cells for tissue engineering of articular cartilage. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers*, 221, 5: 441-50.

Glowacki J., Trepman E., Folkman J. 1983. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 172: 93-98.

Goodsell D. S. 2009. Molecule of the Month. RCSB Protein Data Bank (16. jun. 2009). www.pdb.org (18. jun. 2009).

Guilak F., Jones R. W., Ping Ting-Beall H. and Lee M. G. 1999. The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 7, 1: 59-70

Hancox N. M. 1972. *Biology of Bone: Biological Structure and Function Books*. New York, Cambridge University Press: 199 str.

Hendrich C., Nöth U., Eulert J. 2003. *Cartilage Surgery and Future Perspectives*. Berlin, New York, Springer: 204 str.

Herndon D.N. 2007. *Total burn care*. 3rd edition. Edinburgh, Saunders Elsevier: 878 str.

Holtzer H., Abbott J., Lash J., Holtzer, A. 1960. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro, I. Dedifferentiation of cartilage cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 46: 1533-1542.

Hunziker E. B., Quinn T. M., Hauselmann H. J. 2002. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 7:564-72.

Ian F. R. 2005. *Culture of animal cells: A Manual of Basic Technique*. 5th edition. New York, John Wiley and Sons, Inc: 672 str.

Ikada Y. 2006. *Tissue Engineering: Fundamentals and Applications*. 1st edition. Amsterdam, Boston, Academic Press: 469 str.

Iwasa J., Ochi M., Uchio Y., Katsube K., Adachi N., Kawasaki K. 2003. Effects of cell density on proliferation and matrix synthesis of chondrocytes embedded in atelocollagen gel. *Journal of Artificial Organs*, 27,3: 249-55.

Junqueira L. C., Carneiro J. 2005. *Basic Histology: Text & Atlas*. 11th edition. New York , McGraw-Hill Professional: 544 str.

Kim. H. A., Suh D. I, Song Y. W. 2001. Relationship between chondrocyte apoptosis and matrix depletion in human articular cartilage. *The Journal of Rheumatology* September, 28, 9: 2038-2045.

King M. W. 2008. MedEdPORTAL (nov. 2008). <http://www.aamc.org/mededporta> (4. jun. 2009)

Kino-oka M., Maeda Y., Ota Y., Yashiki S., Sugawara K., Yamamoto T., Taya M.. 2005. Process Design of Chondrocyte Cultures with Monolayer Growth for Cell Expansion and Subsequent Three-Dimensional Growth for Production of Cultured Cartilage. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 1: 67-76.

Kmetec A., Bonaca O., Gorenek M., Kregar-Velikonja N. 2005. Treatment of vesicoureteral reflux by autologous chondrocyte transplantation candidates. In: *Cartilage Weekend: Symposium Program*, Ljubljana, 19.

Kolt G. S., Snyder-Mackler L. 2007. *Physical Therapies in Sport and Exercise*. 2nd edition. Edinburgh, Elsevier Health Sciences: 622 str.

Kregar-Velikonja N., Coer A., Gorenšek M., Knežević M., Kmetec A. 2008. Tissue formation following implantation of cultured elastic chondrocytes for treatment of vesicoureteral reflux. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23: 764–766.

Lewis M. C., Macarthur B. D., Malda J., Pettet G., Please C.P. 2005. Heterogeneous proliferation within engineered cartilaginous tissue: the role of oxygen tension. *Biotechnology and Bioengineering*, 91, 5: 607-15.

Linke W. A., Granzier H. L., Kellermayer M. 2003. *Mechanics of Elastic Biomolecules*. Dordrecht, Kluwer Academic: 596 str.

Lu Y., Dhanaraj S., Wang Z., Bradley D. M., Bowman S. M., Cole B. J., Binette F. 2006. Minced cartilage without cell culture serves as an effective intraoperative cell source for cartilage repair. *Journal of Orthopaedic Research*, 24, 6: 1261-1270.

Madsen K., Moskalewski S., von der Mark K., Friberg U. 1983. Synthesis of proteoglycans, collagen, and elastin by cultures of rabbit auricular chondrocytes--relation to age of the donor. *Developmental Biology*, 96, 1: 63-73.

Malda J., Woodfield T. B. F., van der Vloodt F., Kooy F. K., Martens D. E., Tramper J., van Blitterswijk C. A., Riesle J. 2004. The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on oxygen gradients in tissue engineered cartilaginous constructs. *Biomaterials*, 25, 26: 5773-5780.

Malejczyk J., Moskalewski, S. 1988. Effect of immunosuppression on survival and growth of cartilage produced by transplanted allogeneic epiphyseal chondrocytes. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 232: 292–303.

Maličev E., Kregar-Velikonja N., Barlič A., Alibegović A., Drobnič . 2009. Comparison of articular and auricular cartilage as a cell source for the autologous chondrocyte implantation. *Journal of Orthopaedic Research*, 27, 7: 943-8.

Mandl E. W., van der Veen S. W., Verhaar J. A.N., van Osch G. J.V.M. 2002. Serum-Free Medium Supplemented with High-Concentration FGF2 for Cell Expansion Culture of Human Ear Chondrocytes Promotes Redifferentiation Capacity. *Tissue Engineering*, 8, 4: 573-580.

Marlovits S., Tichy B., Truppe M., Gruber D., Schlegel W. 2003. Collagen expression in tissue engineered cartilage of aged human articular chondrocytes in a rotating bioreactor. *The International journal of artificial organs*, 26, 4: 319-30.

Marlovits S., Trattnig S. 2006. Cartilage repair. *European Journal of Radiology*, 57, 1: 1-2.

Martin I., Obradovic B., Freed L.E., Vunjak-Novakovic G. 1999. Method for Quantitative Analysis of Glycosaminoglycan Distribution in Cultured Natural and Engineered Cartilage. *Annals of Biomedical Engineering*, 27, 5: 656-662.

Martin, J.A., Buckwalter, J.A. 2000. The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Bioarheology*, 37:129-140.

Meisenberg G., Simmons W. H. 2006. Principles of medical biochemistry. 2nd edition. St. Louis, Mosby: 678 str.

Meyer U., Handschel J., Wiesmann H. P., Meyer T. 2009. Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Berlin, Springer: 820 str.

Meyer U., Wiesmann H. P. 2006. Bone and Cartilage Engineering. Berlin, Springer: 264 str.

Mirzayan R., Peterson L. 2006. Cartilage Injury in the Athlete. New York, Thieme: 330 str.

Mithieux S. M., Weiss A. S., Elastin. *Advances in Protein Chemistry*, 70: 437-61.

Mitrovic D. R., Darmon N. 1990. Structural and biochemical abnormalities of articular cartilage in rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, 10, 1: 31-7.

Moskalewski S. 1976. Elastic fiber formation in monolayer and organ cultures of chondrocytes isolated from auricular cartilage. *The American journal of anatomy*, 146, 4: 443-8.

Mukaida T., Urabe K., Naruse K., Aikawa J., Katano M., Hyon S. H., Itoman M. 2005. Influence of three-dimensional culture in a type II collagen sponge on primary cultured and dedifferentiated chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Science*, 10:521–528.

Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. 2006. Harper's Illustrated Biochemistry. 27th edition. New York, McGraw-Hill Professional: 672 str.

Namba R.S., Meuli M., Sullivan K.M., Le A.X., Adzick N. S. 1998. Spontaneous repair of superficial defects in articular cartilage in a fetal lamb model. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 80, 1: 4-10.

Park S. S., Jin H. R., Chi D. H., Taylor R. S. 2004. Characteristics of tissue-engineered cartilage from human auricular chondrocytes. *Biomaterials*, 25, 12: 2363-2369.

Philips G. O., Strong D. M., von Versen R. 2000. Advances in Tissue Banking. 4th edition. Singapore, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: 350 str.

Picot J. 2005. Human cell culture protocols. 2nd edition. Totowa, Humana Press, 359 str.

Poiraudau S., Monteiro I., Anract P., Blanchard O., Revel M., Corvol M. T. 1999. Phenotypic characteristics of rabbit intervertebral disc cells. Comparison with cartilage cells from the same animals. *Spine*, 24, 9: 837-44.

Puelacher W. C., Kim S. W., Vacanti J. P., Schloo B., Mooney D., Vacanti C. A. 1994. Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 23,1: 49-53.

Radosavljevič D., Drobnič M., Koritnik B., Gorenšek M., Pavlovčič V. 2006. Začetki in razvoj transplantacije avtoložnih hondrocitov. *Glasilo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije*, 2: 6.

Rapley R., Harbron S. 2004. *Molecular analysis and genome discovery*. Chichester, John Wiley and Sons: 372 str.

Rastogi S. C. 2003. *Cell And Molecular Biology*. New Delhi, New Age International: 648 str.

Rawlings N.D., Barrett A. J. 1994. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol*, 244: 19–61.

Saadeh P. B., Brent B., Mehrara B. J., Steinbrech D. S., Ting V., Gittes G. K., Longaker M. T. 1999. Human cartilage engineering: chondrocyte extraction, proliferation, and characterization for construct development. *Annals of Plastic Surgery*, 42, 5: 509-13.

Sabatini M., Pastoureau P., De Ceuninck F. 2004. *Cartilage and Osteoarthritis: Cellular and Molecular Tools*. Humana Press: 358 str.

Sakai D. 2008. Future perspectives of cell-based therapy for intervertebral disc disease. *European Spine Journal*, 17, 4: 452-8.

Saltzman W. M. 2004. *Tissue Engineering: Engineering Principles for the Design of Replacement Organs and Tissues*. New York, Oxford University Press: 523 str.

Seibel M. J., Robins S.P., Bilezikian J.P. 2006. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism: Principles and Clinical Applications*. 2nd edition. San Diego, Academic Press: 919 str.

Sittinger M., Huttmacher D. W., Risbud M. V. 2004. Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 5: 411-8.

Swarbrick J., Boylan J. C. 2004. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. 2nd edition. New York, Informa Health Care, 2004: 564 str.

Tay A. G., Farhadi J., Suetterlin R., Pierer G., Heberer M., Martin I. 2004. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Engineering*, 10, 5-6: 762-70.

Thyberg J., Hinek A. 1977. Fine Structure of Rabbit Ear Chondrocytes in vitro and after Autotransplantation. *Cell and Tissue Research* 180, 341-356.

Tran-Khanh N., Hoemann C. D., McKee M. D., Henderson J. E., Buschmann M. D. 2005. Aged bovine chondrocytes display a diminished capacity to produce a collagen-rich, mechanically functional cartilage extracellular matrix. *Journal of Orthopaedic Research*, 23: 1354–1362.

van Griensven M., Kasper C. 2004. *BIOforum Europe: Tissue engineering*, 8, 6: 38-39.

van Mow C., Huiskes R. 2005. *Basic Orthopaedic Biomechanics & Mechano-biology: A Guide for Massage Therapists..* 3rd edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 720 str.

van Osch G. J. V. M., van der Veen S.W., Verwoerd-Verhoef H. L. 2001. In vitro redifferentiation of culture-expanded rabbit and human auricular chondrocytes for cartilage reconstruction. *Plastic and Reconstructive surgery*, 107, 2: 433-440.

von der Mark K., Gauss V., von der Mark H., Müller P. 1977. Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*, 267, 5611: 531-532.

Vunjak-Novakovic G., Obradovic B., Martin I., Bursac P. M., Langer R., Freed L. E.. 1998. Dynamic Cell Seeding of Polymer Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Biotechnology Progress*, 14, 2: 193-202.

Weinstein S. L., Turek S. L., Buckwalter J. A. 2005. 6th edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. *Turek's Orthopaedics: Principles and Their Application*: 761 str.

Westreich R., Kaufman M., Gannon P., Lawson E. 2004. Validating the subcutaneous model of injectable autologous cartilage using a fibrin glue scaffold. *Laryngoscope*, 114: 2154–2160.

Williams R. A. D., Elliott J. C. 1989. *Basic and Applied Dental Biochemistry*. 2nd edition. Edinburgh, Churchill Livingstone: 519 str.

Wnek G. E., Bowlin G. L. 2004. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. 2nd edition. London, Informa Health Care (Four-Volume Set): 3552 str.

Wong M., Hunziker E. B. 1998. Articular cartilage biology and mechanics. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 6: 4–12.

Yang S. Y., Ahn S. T., Rhie J. W., Lee K. Y., Choi J. H., Lee B. J., Oh G. T. 2000. Platelet supernatant promotes proliferation of auricular chondrocytes and formation of chondrocyte mass. *Annals of Plastic Surgery*, 44, 4: 405-11.

Zheng M. H., Willers C., Kirilak L., Yates P., Xu J., Wood D., Shimmin A. 2007. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI): biological and histological assessment. *Tissue Engineering*, 13, 4: 737-46

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku moje diplomske naloge.

Zahvalo namenjam najprej dr. Elviri Maličev za nasvete, potrpežljivost in pomoč pri praktičnem delu v laboratoriju ter podjetju Educell d.o.o., ki mi je omogočilo izvedbo naloge.

Zahvala gre tudi prof. dr. Nini Gunde-Cimerman za nasvete in pomoč pri nastajanju diplomske naloge ter prof. dr. Borisu Bulogu za recenzijo diplomske naloge.

Za moralno podporo pa se iskreno zahvaljujem družini, fantu in prijateljem, ki so me tekom celotnega študija spodbujali in mi stali ob strani v dobrem in slabem.

PRILOGE

Priloga A: Število izoliranih celic pri posameznih pogojih razgradnje

vzorec	čas razgradnje	medij za razgradnjo	pogoji inkubacije	št. celic/mg inkubiranega tkiva
A	3h	0,1 % kol. II	mirovanje	524
B	3h	0,1 % kol. II	mirovanje	190
C	3h	0,1 % kol. II	mirovanje	217
povp.				310
SD				186
A	6h	0,1 % kol. II	mirovanje	3443
B	6h	0,1 % kol. II	mirovanje	3886
C	6h	0,1 % kol. II	mirovanje	2608
povp.				3312
SD				649
A	21h	0,1 % kol. II	mirovanje	4292
B	21h	0,1 % kol. II	mirovanje	4057
C	21h	0,1 % kol. II	mirovanje	2935
povp.				3761
SD				725
A	3h	0,3 % kol. II	mirovanje	2463
B	3h	0,3 % kol. II	mirovanje	1683
C	3h	0,3 % kol. II	mirovanje	2935
povp.				2360
SD				632
A	6h	0,3 % kol. II	mirovanje	3396
B	6h	0,3 % kol. II	mirovanje	4686
C	6h	0,3 % kol. II	mirovanje	2935
povp.				3672
SD				908
A	21h	0,3 % kol. II	mirovanje	5094
B	21h	0,3 % kol. II	mirovanje	4686
C	21h	0,3 % kol. II	mirovanje	3043
povp.				4274
SD				1086

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga A:** Število izoliranih celic pri posameznih pogojih razgradnje.

vzorec	čas razgradnje	medij za razgradnjo	pogoji inkubacije	št. celic/mg inkubiranega tkiva
A	3h	0,5 % kol. II	mirovanje	2673
B	3h	0,5 % kol. II	mirovanje	2476
C	3h	0,5 % kol. II	mirovanje	3587
povp.				2912
SD				593
A	6h	0,5 % kol. II	mirovanje	3538
B	6h	0,5 % kol. II	mirovanje	2971
C	6h	0,5 % kol. II	mirovanje	4022
povp.				3510
SD				526
A	21h	0,5 % kol. II	mirovanje	3160
B	21h	0,5 % kol. II	mirovanje	3600
C	21h	0,5 % kol. II	mirovanje	3152
povp.				3304
SD				256
A	3h	0,5 % kol. II + TR	mirovanje	3040
C	3h	0,5 % kol. II + TR	mirovanje	1413
povp.				2227
SD				1150
A	6h	0,5 % kol. II + TR	mirovanje	4104
C	6h	0,5 % kol. II + TR	mirovanje	3152
povp.				3628
SD				673
A	21h	0,5 % kol. II + TR	mirovanje	3774
C	21h	0,5 % kol. II + TR	mirovanje	1957
povp.				2866
SD				1285
A	3h	0,1 % kol. II	vrtenje	1792
B	3h	0,1 % kol. II	vrtenje	2349
C	3h	0,1 % kol. II	vrtenje	109
povp.				1417
SD				1166

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga A:** Število izoliranih celic pri posameznih pogojih razgradnje.

vzorec	čas razgradnje	medij za razgradnjo	pogoji inkubacije	št. celic/mg inkubiranega tkiva
A	6h	0,1 % kol. II	vrtenje	1310
B	6h	0,1 % kol. II	vrtenje	4229
C	6h	0,1 % kol. II	vrtenje	1848
povp.				2462
SD				1553
A	21h	0,1 % kol. II	vrtenje	2123
B	21h	0,1 % kol. II	vrtenje	5086
C	21h	0,1 % kol. II	vrtenje	3804
povp.				3671
SD				1486
A	3h	0,3 % kol. II	vrtenje	3040
B	3h	0,3 % kol. II	vrtenje	2159
C	3h	0,3 % kol. II	vrtenje	109
povp.				1769
SD				1504
A	6h	0,3 % kol. II	vrtenje	3962
B	6h	0,3 % kol. II	vrtenje	3257
C	6h	0,3 % kol. II	vrtenje	3587
povp.				3602
SD				353
A	21h	0,3 % kol. II	vrtenje	5849
B	21h	0,3 % kol. II	vrtenje	3600
C	21h	0,3 % kol. II	vrtenje	2174
povp.				3874
SD				1853
A	3h	0,5 % kol. II	vrtenje	2484
B	3h	0,5 % kol. II	vrtenje	4724
C	3h	0,5 % kol. II	vrtenje	435
povp.				2548
SD				2145

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga A:** Število izoliranih celic pri posameznih pogojih razgradnje.

vzorec	čas razgradnje	medij za razgradnjo	pogoji inkubacije	št. celic/mg inkubiranega tkiva
A	6h	0,5 % kol. II	vrtenje	3821
B	6h	0,5 % kol. II	vrtenje	6457
C	6h	0,5 % kol. II	vrtenje	3587
povp.				4622
SD				1594
A	21h	0,5 % kol. II	vrtenje	4481
B	21h	0,5 % kol. II	vrtenje	6743
C	21h	0,5 % kol. II	vrtenje	2935
povp.				4720
SD				1915
A	3h	0,5 % kol. II + TR	vrtenje	3082
C	3h	0,5 % kol. II + TR	vrtenje	870
povp.				1976
SD				1564
A	6h	0,5 % kol. II + TR	vrtenje	3255
C	6h	0,5 % kol. II + TR	vrtenje	4674
povp.				3255
SD				4674
A	21h	0,5 % kol. II + TR	vrtenje	3302
C	21h	0,5 % kol. II + TR	vrtenje	2935
povp.				3119
SD				260
A	3h	0,1 % kol. II	mešanje	943
B	3h	0,1 % kol. II	mešanje	762
C	3h	0,1 % kol. II	mešanje	109
povp.				605
SD				439
A	6h	0,1 % kol. II	mešanje	1274
B	6h	0,1 % kol. II	mešanje	2400
C	6h	0,1 % kol. II	mešanje	1522
povp.				1732
SD				592

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga A:** Število izoliranih celic pri posameznih pogojih razgradnje

vzorec	čas razgradnje	medij za razgradnjo	pogoji inkubacije	št. celic/mg inkubiranega tkiva
A	21h	0,1 % kol. II	mešanje	2642
B	21h	0,1 % kol. II	mešanje	3257
C	21h	0,1 % kol. II	mešanje	1196
povp.				2365
SD				1058
A	3h	0,3 % kol. II	mešanje	3381
B	3h	0,3 % kol. II	mešanje	1619
C	3h	0,3 % kol. II	mešanje	543
povp.				1848
SD				1433
A	6h	0,3 % kol. II	mešanje	3679
B	6h	0,3 % kol. II	mešanje	3543
C	6h	0,3 % kol. II	mešanje	1522
povp.				2915
SD				1208
A	21h	0,3 % kol. II	mešanje	3585
B	21h	0,3 % kol. II	mešanje	2800
C	21h	0,3 % kol. II	mešanje	2065
povp.				2817
SD				760
A	3h	0,5 % kol. II	mešanje	2201
B	3h	0,5 % kol. II	mešanje	2508
C	3h	0,5 % kol. II	mešanje	978
povp.				1896
SD				809
A	6h	0,5 % kol. II	mešanje	2972
B	6h	0,5 % kol. II	mešanje	2571
C	6h	0,5 % kol. II	mešanje	3697
povp.				3080
SD				571

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga A:** Število izoliranih celic pri posameznih pogojih razgradnje

vzorec	čas razgradnje	medij za razgradnjo	pogoji inkubacije	št. celic/mg inkubiranega tkiva
A	21h	0,5 % kol. II	mešanje	3632
B	21h	0,5 % kol. II	mešanje	2686
C	21h	0,5 % kol. II	mešanje	1739
povp.				2686
SD				947
A	3h	0,5 % kol. II + TR	mešanje	2264
C	3h	0,5 % kol. II + TR	mešanje	1739
povp.				2002
SD				371
A	6h	0,5 % kol. II + TR	mešanje	4906
C	6h	0,5 % kol. II + TR	mešanje	2717
povp.				3812
SD				1548
A	21h	0,5 % kol. II + TR	mešanje	4151
C	21h	0,5 % kol. II + TR	mešanje	2500
povp.				3326
SD				1167

Priloga B: Odstotek živih celic pri posameznih pogojih razgradnje.

vzorec	čas razgradnje	medij za razgradnjo	pogoji inkubacije	odstotek živih celic (%)
A	3h	0,1 % kol. II	mirovanje	90
B	3h	0,1 % kol. II	mirovanje	83,3
C	3h	0,1 % kol. II	mirovanje	100
povp.				91
SD				8
A	6h	0,1 % kol. II	mirovanje	94,5
B	6h	0,1 % kol. II	mirovanje	92,6
C	6h	0,1 % kol. II	mirovanje	91,6
povp.				93
SD				1
A	21h	0,1 % kol. II	mirovanje	93,4
B	21h	0,1 % kol. II	mirovanje	95,8
C	21h	0,1 % kol. II	mirovanje	88,8
povp.				93
SD				4
A	3h	0,3 % kol. II	mirovanje	92,5
B	3h	0,3 % kol. II	mirovanje	94,3
C	3h	0,3 % kol. II	mirovanje	81,5
povp.				89
SD				7
A	6h	0,3 % kol. II	mirovanje	94,4
B	6h	0,3 % kol. II	mirovanje	96,3
C	6h	0,3 % kol. II	mirovanje	92,6
povp.				94
SD				2
A	21h	0,3 % kol. II	mirovanje	95,4
B	21h	0,3 % kol. II	mirovanje	96,6
C	21h	0,3 % kol. II	mirovanje	89,3
povp.				94
SD				4

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga B:** Odstotek živih celic pri posameznih pogojih razgradnje.

vzorec	čas razgradnje	medij za razgradnjo	pogoji inkubacije	odstotek živih celic (%)
A	3h	0,5 % kol. II	mirovanje	90,2
B	3h	0,5 % kol. II	mirovanje	91
C	3h	0,5 % kol. II	mirovanje	94
povp.				92
SD				2
A	6h	0,5 % kol. II	mirovanje	93,3
B	6h	0,5 % kol. II	mirovanje	90,4
C	6h	0,5 % kol. II	mirovanje	94,6
povp.				93
SD				2
A	21h	0,5 % kol. II	mirovanje	97
B	21h	0,5 % kol. II	mirovanje	88,9
C	21h	0,5 % kol. II	mirovanje	79,3
povp.				88
SD				9
A	3h	0,5 % kol. II + TR	mirovanje	94
C	3h	0,5 % kol. II + TR	mirovanje	69,2
povp.				82
SD				18
A	6h	0,5 % kol. II + TR	mirovanje	94,2
C	6h	0,5 % kol. II + TR	mirovanje	79,3
povp.				87
SD				11
A	21h	0,5 % kol. II + TR	mirovanje	92,5
C	21h	0,5 % kol. II + TR	mirovanje	76,9
povp.				85
SD				11
A	3h	0,1 % kol. II	vrtenje	91,2
B	3h	0,1 % kol. II	vrtenje	92,6
C	3h	0,1 % kol. II	vrtenje	100
povp.				95
SD				5

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga B:** Odstotek živih celic pri posameznih pogojih razgradnje

vzorec	čas razgradnje	medij za razgradnjo	pogoji inkubacije	odstotek živih celic (%)
A	6h	0,1 % kol. II	vrtenje	88
B	6h	0,1 % kol. II	vrtenje	89,2
C	6h	0,1 % kol. II	vrtenje	88,2
povp.				88
SD				1
A	21h	0,1 % kol. II	vrtenje	88,9
B	21h	0,1 % kol. II	vrtenje	94,4
C	21h	0,1 % kol. II	vrtenje	91,4
povp.				92
SD				3
A	3h	0,3 % kol. II	vrtenje	94
B	3h	0,3 % kol. II	vrtenje	92,6
C	3h	0,3 % kol. II	vrtenje	100
povp.				96
SD				4
A	6h	0,3 % kol. II	vrtenje	91,7
B	6h	0,3 % kol. II	vrtenje	94,7
C	6h	0,3 % kol. II	vrtenje	97
povp.				94
SD				3
A	21h	0,3 % kol. II	vrtenje	88,7
B	21h	0,3 % kol. II	vrtenje	93,6
C	21h	0,3 % kol. II	vrtenje	85
povp.				89
SD				4
A	3h	0,5 % kol. II	vrtenje	93,7
B	3h	0,5 % kol. II	vrtenje	89,5
C	3h	0,5 % kol. II	vrtenje	75
povp.				86
SD				10

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga B:** Odstotek živih celic pri posameznih pogojih razgradnje

A	6h	0,5 % kol. II	vrtenje	92,6
B	6h	0,5 % kol. II	vrtenje	95,6
C	6h	0,5 % kol. II	vrtenje	97
povp.				95
SD				2
A	3h	0,5 % kol. II + TR	vrtenje	91,8
C	3h	0,5 % kol. II + TR	vrtenje	87,5
povp.				90
SD				3
A	6h	0,5 % kol. II + TR	vrtenje	87
C	6h	0,5 % kol. II + TR	vrtenje	88,4
povp.				88
SD				1
A	21h	0,5 % kol. II + TR	vrtenje	91,4
C	21h	0,5 % kol. II + TR	vrtenje	81,5
povp.				86
SD				7
A	3h	0,1 % kol. II	mešanje	91,7
B	3h	0,1 % kol. II	mešanje	90
C	3h	0,1 % kol. II	mešanje	100
povp.				94
SD				5
A	6h	0,1 % kol. II	mešanje	81,5
B	6h	0,1 % kol. II	mešanje	81
C	6h	0,1 % kol. II	mešanje	78,6
povp.				80
SD				2
A	21h	0,1 % kol. II	mešanje	87,5
B	21h	0,1 % kol. II	mešanje	93
C	21h	0,1 % kol. II	mešanje	72,7
povp.				84
SD				10

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga B:** Odstotek živih celic pri posameznih pogojih razgradnje.

A	3h	0,3 % kol. II	mešanje	94,2
B	3h	0,3 % kol. II	mešanje	88,2
C	3h	0,3 % kol. II	mešanje	60
povp.				81
SD				18
A	6h	0,3 % kol. II	mešanje	89,7
B	6h	0,3 % kol. II	mešanje	91,9
C	6h	0,3 % kol. II	mešanje	78,6
povp.				87
SD				7
A	21h	0,3 % kol. II	mešanje	90,8
B	21h	0,3 % kol. II	mešanje	91,8
C	21h	0,3 % kol. II	mešanje	78,9
povp.				87
SD				7
A	3h	0,5 % kol. II	mešanje	94,3
B	3h	0,5 % kol. II	mešanje	93,7
C	3h	0,5 % kol. II	mešanje	77,8
povp.				89
SD				9
A	6h	0,5 % kol. II	mešanje	88,9
B	6h	0,5 % kol. II	mešanje	93,3
C	6h	0,5 % kol. II	mešanje	85,3
povp.				89
SD				4
A	21h	0,5 % kol. II	mešanje	96,1
B	21h	0,5 % kol. II	mešanje	87,2
C	21h	0,5 % kol. II	mešanje	75
povp.				86
SD				11

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga B:** Odstotek živih celic pri posameznih pogojih razgradnje.

vzorec	čas razgradnje	medij za razgradnjo	pogoji inkubacije	odstotek živih celic (%)
A	3h	0,5 % kol. II + TR	mešanje	83,3
C	3h	0,5 % kol. II + TR	mešanje	68,8
povp.				76
SD				10
A	6h	0,5 % kol. II + TR	mešanje	92,3
C	6h	0,5 % kol. II + TR	mešanje	76
povp.				84
SD				12
A	21h	0,5 % kol. II + TR	mešanje	72
C	21h	0,5 % kol. II + TR	mešanje	56,5
povp.				64
SD				11

Priloga C: Rezultati statističnih analiz podatkov števila izoliranih celic pri posameznih pogojih razgradnje – Friedmanov test ($p < 0,05$; statistično pomembne razlike so označene rdeče)

Fridmanov test

0,1% kol II, 3h		0,1% kol II, 6h		0,1% kol II, 21h	
N	3	N	3	N	3
χ^2	1,166667	χ^2	4,666667	χ^2	2
df	2	df	2	df	2
asimp. sig.	0,558035	asimp. sig.	0,096972	asimp. sig.	0,367879

0,3% kol II, 3h		0,3% kol II, 6h		0,3% kol II, 21h	
N	3	N	3	N	3
χ^2	0	χ^2	0,666667	χ^2	4,666667
df	2	df	2	df	2
asimp. sig.	1	asimp. sig.	0,716531	asimp. sig.	0,096972

0,5% kol II, 3h		0,5% kol II, 6h		0,5% kol II, 21h	
N	3	N	3	N	3
χ^2	0,666667	χ^2	2	χ^2	2,666667
df	2	df	2	df	2
asimp. sig.	0,716531	asimp. sig.	0,367879	asimp. sig.	0,263597

0,5% kol II + TR, 3h		0,5% kol II + TR, 6h		0,5% kol II + TR, 21h	
N	2	N	2	N	2
χ^2	0	χ^2	0	χ^2	1
df	2	df	2	df	2
asimp. sig.	1	asimp. sig.	1	asimp. sig.	0,606531

Priloga D: Rezultati statističnih analiz podatkov deleža živih izoliranih celic pri posameznih pogojih razgradnje – Friedmanov test ($p < 0,05$; statistično pomembne razlike so označene rdeče)

Fridmanov test

0,1% kol II, 3h		0,1% kol II, 6h		0,1% kol II, 21h	
N	3	N	3	N	3
λ^2	2	λ^2	6	λ^2	4,666667
df	2	df	2	df	2
asimp. sig.	0,367879	asimp. sig.	0,04978707	asimp. sig.	0,096972

0,3% kol II, 3h		0,3% kol II, 6h		0,3% kol II, 21h	
N	3	N	3	N	3
λ^2	0,666667	λ^2	4,666667	λ^2	4,666667
df	2	df	2	df	2
asimp. sig.	0,716531	asimp. sig.	0,096972	asimp. sig.	0,096972

0,5% kol II, 3h		0,5% kol II, 6h		0,5% kol II, 21h	
N	3	N	3	N	3
λ^2	2,666667	λ^2	2,666667	λ^2	4,666667
df	2	df	2	df	2
asimp. sig.	0,263597	asimp. sig.	0,263597	asimp. sig.	0,096972

0,5% kol II + TR, 3h		0,5% kol II + TR, 6h		0,5% kol II + TR, 21h	
N	2	N	2	N	2
λ^2	3	λ^2	1	λ^2	3
df	2	df	2	df	2
asimp. sig.	0,22313	asimp. sig.	0,60653	asimp. sig.	0,22313

Priloga E: Normalizirane vrednosti izražanja izbranih v vzorcih petih darovalcev in različnih pogojih gojenja

vzorci biopsij							
	kol I	kol II	agr	ver	els	kol II/kol I	agr/ver
dar. 1	88,5818	29,423	7,5888	19,0781	23,0049	0,332156267	0,39777546
dar. 2	77,918	13,7737	8,0772	3,7421	13,0308	0,176771734	2,15846717
dar. 3	61,7741	13,9952	15,5713	20,6113	50,2715	0,226554495	0,75547394
dar. 4	399,9722	65,3381	64,8593	118,9207	477,9633	0,163356603	0,54539958
dar. 5	156,4498	2,3304	16,4848	22,3449	14,93	0,014895513	0,73774329
mediana	88,5818	13,9952	15,5713	20,6113	23,0049	0,176771734	0,73774329
enoslojne kulture							
dar. 1	24,9426	0,0465	0,1706	19,766	1,5794	0,00186428	0,00863098
dar. 2	30,6937	0,3924	1,7458	35,0116	20,1062	0,012784382	0,04986347
dar. 3	85,1042	0,00466	0,0878	29,6314	1,8411	0,00005476	0,00296307
dar. 4	428,8882	0,2383	0,3921	42,5224	68,8468	0,000555623	0,00922102
dar. 5	126,514	0,0546	0,1846	66,9254	0,4828	0,000431573	0,00275830
mediana	85,1042	0,0546	0,1846	35,0116	1,8411	0,000555623	0,00863098
tridimenzionalne kulture (alginatni hidrogel)							
dar. 1	5,083	161,486	42,9609	11,9204	51,0751	31,76982097	3,60398141
dar. 2	129,9341	1888,213	919,526	97,3947	652,457	14,53208203	9,44123243
dar. 3	24,9688	5,8546	5,9598	8,5289	3,1973	0,234476627	0,69877710
dar. 4	5,8294	13,6351	9,9829	204,5849	1156,024	2,339022884	0,04879588
dar. 5	10,5553	7,4269	5,8741	4,5639	2,2479	0,703618088	1,28707903
mediana	10,5553	13,6351	9,9829	11,9204	51,0751	2,339022884	1,28707903

Priloga F: Rezultati statističnih analiz podatkov izražanja posameznih genov –
Friedmanov in Wilcoxonov test

Fridmanov test

kol II		kol I		agr	
N	5	N	5	N	5
λ^2	7,6	λ^2	2,8	λ^2	7,6
df	2	df	2	df	2
asimp. sig.	0,02237	asimp. sig.	0,24659697	asimp. sig.	0,02237

ver		els	
N	5	N	5
λ^2	1,2	λ^2	5,2
df	2	df	2
asimp. sig.	0,54881	asimp. sig.	0,07427

kol II/kol I		agr/ver	
N	5	N	5
λ^2	10	λ^2	7,6
df	2	df	2
asimp. sig.	0,00674	asimp. sig.	0,02237

Wilcoxonov test

kol II				kol I		
	biopsija - enosloj	biopsija- alginat	enosloj- alginat	biopsija - enosloj	biopsija- alginat	biopsija - enosloj
Z	-2,0226	-0,6742	-2,0226	-1,21356	-1,48324	-1,21356
asimp. sig.	0,04311	0,50018	0,04311	0,22492	0,13801	0,22492

agr				ver		
	biopsija - enosloj	biopsija- alginat	enosloj- alginat	biopsija - enosloj	biopsija- alginat	biopsija - enosloj
Z	-2,0226	-0,13484	-2,0226	-0,6742	-0,40452	-0,40452
asimp. sig.	0,04311	0,89274	0,04311	0,50018	0,68583	0,68583

els			
	biopsija - enosloj	biopsija- alginat	enosloj- alginat
Z	-1,75292	-0,94388	-2,0226
asimp. sig.	0,079615	0,34523	0,04311

kol II/kol I				agr/ver		
	biopsija - enosloj	biopsija- alginat	enosloj- alginat	biopsija - enosloj	biopsija- alginat	biopsija - enosloj
Z	-2,0226	-2,0226	-2,0226	-2,0226	-1,21356	-2,0226
asimp. sig.	0,04311	0,04311	0,04311	0,22492	0,04311	0,04311

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Klara LESJAK

**GOJENJE CELIC ELASTIČNEGA HRUSTANCA ZA
UPORABO V TKIVNEM INŽENIRSTVU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009