

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Irina NEMET

**OPREDELITEV LASTNOSTI MEZENHIMSKIH
MATIČNIH CELIC IN NJIHOVEGA VPLIVA NA
IZOLACIJO CELIC CD133+ IZ PRIMARNE
KULTURE GLIOBLASTOMA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Irina NEMET

**OPREDELITEV LASTNOSTI MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC
IN NJIHOVEGA VPLIVA NA IZOLACIJO CELIC CD133+ IZ
PRIMARNE KULTURE GLIOBLASTOMA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE STUDY OF MESENCHYMAL STEM CELL PROPERTIES AND
THEIR IMPACT ON CD133+ CELL ISOLATION FROM PRIMARY
GBM CULTURES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

«En vérité, le chemin importe peu, la volonté d'arriver suffit à tout»

(Albert Camus, *Le Mythe de Sisyphe*)

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v celičnem laboratoriju Nacionalnega instituta za biologijo v Ljubljani, na oddelku za gensko toksikologijo in biologijo raka.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 15.9.2010 za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miomirja Kneževića, za somentorico dr. Heleno Motaln in za recezentko prof. dr. Tamara Lah Turnšek.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Član: asist. dr. Helena MOTALN
Nacionalni institut za biologijo, Oddelek za gensko toksikologijo in biologijo raka, Ljubljana

Član: prof. dr. Tamara LAH TURNŠEK
Nacionalni institut za biologijo, Ljubljana

Datum zagovora:

Izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Irina NEMET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577:616(043.2)=163.6
KG molekularna biologija/klinična medicina/mezenhimske matične celice/MSC/glioblastomi/možganske tumorske matične celice/BTSC/CD133
KK AGRIS /
AV NEMET, Irina
SA KNEŽEVIĆ, Miomir (mentor)/MOTALN, Helena (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2011
IN OPREDELITEV LASTNOSTI MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IN NJIHOVEGA VPLIVA NA IZOLACIJO CELIC CD133+ IZ PRIMARNE KULTURE GLIOBLASTOMA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XVII, 77 str., 17 pregl., 27 sl., 118 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Mezenhimske matične celice iz kostnega mozga (MSC) imajo velik terapevtski potencial in se že uporabljajo pri zdravljenju različnih bolezni. Novejše raziskave nakazujejo, da so celice MSC zaradi sposobnosti selektivne migracije v področja poškodb/vnetij potencialno uporabne tudi pri zdravljenju možganskih tumorjev. Glioblastoma multiforme (GBM) so visoko maligni, invazivni in zaradi sposobnosti infiltriranja posameznih celic v okoljno tkivo, trenutno neozdravljivi možganski tumorji. V heterogeni populaciji celic GBM so za vzdrževanje in odpornost tumorjev na radio- in kemoterapijo odgovorne celice, ki izražajo celični označevalci CD133 (celice CD133+). Te celice so poimenovali BTSC oz. možganske tumorske matične celice. Namen diplomskega dela je bil ovrednotiti *in vitro* lastnosti dveh linij celic MSC izoliranih iz kostnega mozga (MSC3 in MSC4) in proučiti njihov vpliv na izolacijo tumorskih celic CD133+ iz primarne kulture GBM. Z določevanjem populacijskega podvojitvenega časa (PDT) celic MSC smo ugotovili, da se celice MSC izolirane iz enakega tkiva različnih donorjev razlikujejo v hitrosti proliferacije in da njihov proliferacijski potencial s podaljšanim časom *in vitro* gojenja upada. Senescenco smo določali z razgradnjo kromogenega substrata X-gal, kar korelira z aktivnostjo encima β-galaktosidaza. Tako smo dokazali, da je pri poznejših pasažah celic MSC % senescentnih celic vedno višji. Multipotentni potencial celic MSC smo potrdili z inducirano adipogeno, hondrogeno in osteogeno diferenciacijo pri pasažah 7 in 8. Proučevanje vpliva kondicioniranega medija celic MSC na celice CD133+ je pokazalo, da imajo dejavniki celic MSC zaviralne učinke na proliferacijo celic CD133+. Po gojenju celic GBM v kondicioniranem mediju celic MSC je bil % z magnetnim ločevanjem izoliranih celic CD133+ nižji (3,01% pri MSC3-CM in 3,41% pri MSC4-CM) kot pri kontroli (6,24%), kjer smo celice GBM gojili v lastnem kondicioniranem mediju. Dobljeni rezultati potrjujejo protitumorski potencial celic MSC, zato predvidevamo, da bodo celice MSC v prihodnje omogočile učinkovito zdravljenje glioblastomov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577:616(043.2)=163.6
CX molecular biology/clinical medicine/mesenchymal stem cells/MSC/glioblastoma/
brain tumour stem cell/BTSC/CD133
CC AGRIS /
AU NEMET, Irina
AA KNEŽEVIĆ, Miomir (supervisor)/MOTALN, Helena (co-supervisor)
PP SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in
Biotechnology
PY 2011
TI THE STUDY OF MESENCHYMAL STEM CELL PROPERTIES AND THEIR
IMPACT ON CD133+ CELL ISOLATION FROM PRIMARY GBM CULTURES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XVII, 77 p., 17 tab., 27 fig., 118 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Mesenchymal stem cells (MSCs) exhibit significant therapeutic potential and are already being used as a treatment for many diseases. Recent research in the field has suggested that MSCs selectively migrate to areas of injury/inflammation and can therefore be useful in brain tumour treatment. Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly malignant and invasive tumour, whose individual cells have the ability to infiltrate into the surrounding tissue, making conventional treatment methods unsuccessful. In the heterogeneous cell population of GBM, the tumour maintenance and resistance to chemo- and radiotherapy is conferred by cells expressing the cell marker CD133 (cells CD133+). The cells are called BTSC or *Brain Tumour Stem Cells*. The purpose of this graduation thesis was the *in vitro* characterisation of two lines of bone-marrow MSC cells (MSC3 and MSC4) and the evaluation of their influence on the isolation of tumour cells CD133+ from a primary GBM culture. Examining the population doubling time (PDT) of MSCs has shown that the cells isolated from a certain tissue of different donors do not exhibit the same proliferative kinetics properties and that their proliferative ability is reduced by prolonged *in vitro* cultivation. The senescence was investigated through degradation of X-gal chromogene substrate which correlates with β-galactosidase activity. We noticed that the % of senescent cells becomes higher in later passages of MSCs. The multipotent potential of MSCs was confirmed by induced adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation at passages 7 and 8, respectively. Examining the effects of MSC condition media on the CD133+ cells indicated that the MSC's factors exhibit inhibitory effects on the proliferation of CD133+ cells. In GBM cultures grown in the MSC condition media, the % of CD133+ cells isolated with magnetic sorting was lower (3,01% with MSC3-CM and 3,41% with MSC4-CM) compared to the control (6,24%) where GBM cells were cultured in their own condition media. Obtained results demonstrate the antitumour effects of MSCs, and thus we assume that MSCs will enable effective glioblastoma treatment in the future.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	X
Okrajšave in simboli	XII
Slovarček	XIV
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	1
2.1 MATIČNE CELICE	1
2.1.1 Mezenhimske matične celice (MSC)	3
2.1.1.1 Lastnosti celic MSC	4
2.1.1.2 Proliferacija celic MSC	6
2.1.1.3 Diferenciacija celic MSC	7
2.1.1.4 Senescenca	8
2.1.1.5 Gojenje celic MSC	10
2.1.1.6 Spontana transformacija celic MSC	10
2.2 GLIOMI	11
2.2.1 Lastnosti rakavih celic	11
2.2.2 Možganski tumorji	12
2.2.3 Glioblastomi	13
2.2.4 Nevralne matične celice (NSC)	14
2.2.5 Možganske tumorske matične celice (BTSC)	15

2.2.5.1 Izvor možganskih tumorskih matičnih celic (BTSC)	17
2.2.6 Iniciacija in razvoj možganskih tumorjev	18
2.2.7 Označevalci celic v možganskih tumorjih	20
2.2.7.1 CD133 (prominin-1)	20
2.2.7.2 Nestin	20
2.2.8 Klinični pomen možganskih tumorskih matičnih celic (BTSC)	21
2.3 UPORABA CELIC MSC V TERAPEVTSKE NAMENE	23
2.3.1 Zdravljenje gliomov s pomočjo celic MSC	24
3 MATERIALI IN METODE	26
3.1 CILJI RAZISKAVE	26
3.2 DELOVNA HIPOTEZA	27
3.3 MATERIALI	28
3.3.1 Kemikalije in laboratorijska oprema	28
3.3.1.1 Kemikalije	28
3.3.1.2 Laboratorijska oprema	29
3.4 POTEK DELA	30
3.5 METODE	32
3.5.1 Priprava gojišča za celice MSC in celice GBM	32
3.5.2 Gojenje in precepljanje celic	33
3.5.3 Metoda štetja celic na hemocitometru	34
3.5.4 Spremljanje morfoloških sprememb celic MSC z uporabo svetlobnega mikroskopa	35
3.5.5 Ocena proliferacijskega potenciala celic MSC z določanjem podvojitvenega časa populacije (angl.«PDT»)	35
3.5.6 Analiza nastopa senescence v kulturah celic MSC pri dolgotrajnjem <i>in vitro</i> gojenju	35
3.5.6.1 Metoda barvanja senescentnih celic z X-Gal	35
3.5.7 Analiza diferenciacijskega potenciala celic MSC	36
3.5.8 Adipogeneza	36
3.5.8.1 Detekcija znotrajceličnih maščobnih vakuol z metodo »Oil Red O Staining«	37

3.5.9 Hondrogeniza	37
3.5.9.1 Detekcija mukopolisaharidov in glikozaminoglikanov	38
3.5.10 Osteogeniza	38
3.5.10.1 Detekcija kalcijevih depositov: barvanje po Von Kossa	38
3.5.11 Vpliv MSC kondicioniranega medija na bogatenje primarne kulture celic GBM s populacijo celic CD133+	39
3.5.11.1 Gojenje celic GBM	39
3.5.11.2 Priprava kondicioniranega medija celic MSC	39
3.5.11.3 Opis poskusa	39
3.5.11.4 Magnetno ločevanje celic	39
4 REZULTATI	41
4.1 OCENA PROLIFERACIJSKEGA POTENCIALA CELIC MSC Z DOLOČANJEM PODVOJITVENEGA ČASA POPULACIJE (ANGL.«PDT»)	41
4.2 SPREMLJANJE MORFOLOŠKIH SPREMemb CELIC MSC Z UPORABO SVETLOBNEGA MIKROSKOPA	43
4.3 ANALIZA NASTOPA SENESCENCE V KULTURAH CELIC MSC PRI DOLGOTRAJNEM <i>IN VITRO</i> GOJENJU	45
4.4 ANALIZA DIFERENCIACIJSKEGA POTENCIALA CELIC MSC	46
4.4.1 Adipogena diferenciacija	46
4.4.2 Hondrogena diferenciacija	49
4.4.3 Osteogenica diferenciacija	52
4.5 DOLOČANJE VPLIVA KONDICIONIRANEGA MEDIJA CELIC MSC NA BOGATENJE KULTURE CELIC GBM S POPULACIJO CELIC CD133+	54
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	58
5.1 OCENA PROLIFERACIJSKEGA POTENCIALA CELIC MSC Z DOLOČANJEM PODVOJITVENEGA ČASA POPULACIJE (ANGL.«PDT»)	58
5.2 ANALIZA NASTOPA SENESCENCE PRI DOLGOTRAJNEM <i>IN VITRO</i> GOJENJU CELIC MSC	59

5.3 DOLOČANJE DIFERENCIACIJSKEGA POTENCIALA CELIC MSC	61
5.4 DOLOČANJE VPLIVA KONDICIONIRANEGA MEDIJA CELIC MSC NA BOGATENJE KULTURE CELIC GBM S POPULACIJO CELIC CD133+	63
6 POVZETEK	65
7 VIRI	67
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Najpogostejši celični označevalci celic MSC iz kostnega mozga	4
Pregl. 2: WHO stopnje možganskih tumorjev	13
Pregl. 3: Ključna odkritja na področju možganskih tumorskih matičnih celic	15
Pregl. 4: Lastnosti možganskih tumorskih matičnih celic	17
Pregl. 5: Seznam uporabljenih kemikalij	28
Pregl. 6: Seznam uporabljene laboratorijske opreme	29
Pregl. 7: Lastnosti uporabljenih celic MSC	32
Pregl. 8: Sestava medija za gojenje celic MSC	33
Pregl. 9 : Sestava medija za gojenje celic GBM	33
Pregl. 10: Enačba za izračun števila celic pri štetju s hemocitomerom	34
Pregl. 11: Sestava medijev za diferenciacijo celic MSC v adipocyte	37
Pregl. 12: Sestava medija za diferenciacijo celic MSC v hondrocite	38
Pregl. 13: Sestava medija za diferenciacijo celic MSC v osteocite	38
Pregl. 14: Vpliv kondicioniranega medija celic MSC na zastopanost (%) celic CD133+ v primarni kulti GBM	54
Pregl. 15: Normalizirane vrednosti rezultatov predstavljenih v preglednici 14	54
Pregl. 16: Vpliv kondicioniranega medija celic MSC na zastopanost (%) celic CD133- v primarni kulti GBM	55
Pregl. 17: Normalizirane vrednosti rezultatov predstavljenih v preglednici 16	55

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Spremljanje diferenciacijskega potenciala matičnih celic med razvojem osebka	2
Sl. 2: Mezenhimske matične celice v kulturi	3
Sl. 3: Morfološke spremembe celic MSC pri daljšem <i>in vitro</i> gojenju	7
Sl. 4: Multipotentni diferenciacijski potencial mezenhimskih matičnih celic (MSC)	8
Sl. 5: Primarna kultura glioblastomskih celic	12
Sl. 6: Prikaz niš nevralnih matičnih celic (NSC) v možganih odraslih ljudi	14
Sl. 7: Lastnosti možganskih tumorskih matičnih celic (BTSC)	16
Sl. 8: Nastanek celic BTSC	18
Sl. 9: Stohastični in hierarhični koncept nastanka rakavih celic	19
Sl. 10: Fuzija celic kot možen mehanizem celične transdiferenciacije	19
Sl. 11: Shematski prikaz poteka dela	31
Sl. 12: Hemocitometer	34
Sl. 13: Podvojitveni čas celic MSC3	42
Sl. 14: Podvojitveni čas celic MSC4	42
Sl. 15: Morfologija celic MSC pri različnih pasažah	44
Sl. 16: Morfologija celic MSC4 pri pasaži 21	45
Sl. 17: Ocena senescence celic MSC	46
Sl. 18: Inducirana adipogena diferenciacija celic MSC3	47
Sl. 19: Inducirana adipogena diferenciacija celic MSC4	48
Sl. 20: Inducirana hondrogena diferenciacija celic MSC3	50
Sl. 21: Inducirana hondrogena diferenciacija celic MSC4	51
Sl. 22: Inducirana osteogena diferenciacija celic MSC3	52
Sl. 23: Inducirana osteogena diferenciacija celic MSC4	53
Sl. 24: Vpliv kondicioniranega medija celic MSC na zastopanost celične subpopulacije CD133+ v primarni kulturi celic GBM	55

Sl. 25: Vpliv kondicioniranega medija celic MSC na zastopanost celične subpopulacije CD133- v primarni kulturi celic GBM	56
Sl. 26: Razmerje (v %) med celicami CD133- in CD133+ v primarni kulturi GBM po tretirjanju s kondicioniranimi mediji	56
Sl. 27: Izplen celic GBM po magnetnem ločevanju v posameznih poskusih	57

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

°C	stopinja Celzija
AS	avtologni serum
BM-MSC	matične celice izolirane iz kostnega mozga
BTSC	možganska tumorska matična celica (<i>angl. Brain Tumour Stem Cell</i>)
CD133	označevalec pripadnosti (<i>angl. Cluster of Differentiation</i>)
DMEM	celično gojišče po Dulbecco (<i>angl. Dulbecco` s Modified Eagle` s Medium</i>)
DMSO	dimetilsulfoksid
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
FBS/FCS	goveji/telečji serum
FGF	fibroblastni rastni faktor (<i>angl. Fibroblast Growth Factor</i>)
GBM	tumorske celice iz možganskega tumorja <i>Glioblastoma multiforme</i>
HLA-xy	antigen za določanje tkivne skladnosti
IL-xy	interlevkin
L-Gln	aminokislina L-glutamin (Gln)
L-Lys	aminokislina L-lizin; poli (L)-Lys-raztopina poli- lizina
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (PHK) (<i>angl. Major Histocompatibility Complex</i>)
miRNA	mikro RNA
mRNA	informacijska RNA
MSC	mezenhimska matična celica
Na-Pyr	natrijev piruvat
NIB	Nacionalni inštitut za biologijo v Ljubljani, Slovenija
NSC	živčne/nevralne matične celice (<i>angl. Nevral Stem Cell</i>)
PBS	fosfatni pufer
PDGF	rastni faktor iz krvnih ploščic (<i>angl. Platelet-Derived Growth Factor</i>)
Pen/Strep	raztopina antibiotika in antimikotika penicilin/streptomicin
RNA/DNA	ribonukleinska kislina/deoksiribonukleinska kislina
TGF-β	transformirajoči rastni faktor beta (<i>angl. Transforming Growth Factor Beta</i>)
TMC	transformirane mezenhimske celice
UCB-MSC	matične celice izolirane iz popkovnične krvi

vrt/min	vrtljajev na minuto
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (<i>angl. World Health Organization</i>)
X-Gal	barvilo, X-Gal je substrat za encim beta-galaktozidazo

SLOVARČEK

Pojem	Razlaga
Apoptoza	Apoptoza je programirana celična smrt. Gre za uravnavan proces, zato govorimo tudi o celičnem samomoru. V nasprotju z nekrozo tj. patološko celično smrto ne povzroča vnetij.
Asimetrična celična delitev*	Celična delitev, pri kateri nastaneta dve različno diferencirani hčerinski celici, od katerih je ena enaka svoji prednici in ohrani njeno matičnost, to je sposobnost samoobnove in pluripotence.
CD (ang. cluster of differentiation)*	Enotni sistem označevanja antigenov na površini celic z monoklonskimi protitelesi.
CD133	CD133 je glikoprotein, pri človeku in glodalcih znan tudi kot Prominin-1. Je sestavni del transmembranskega glikoproteina iz petih domen, ki se nahaja na zunanjji strani celične membrane. CD133 se izraža v krvotvornih matičnih celicah, endotelijskih progenitorskih celicah, glioblastomih, nevralnih in glia matičnih celicah ter nekaterih drugih celičnih tipih.
Celična kultura*	Gojenje celic <i>in vitro</i> v umetnem mediju v raziskovalne, diagnostične, terapevtske ali proizvodno-biotehnološke namene.
Celična linija*	Definirana celična populacija, ki jo daljše časovno obdobje ohranjamo v kulturi <i>in vitro</i> . Vse celice ene linije so potomke skupne prednike celice določenega tipa ali matične celice.
Celična transformacija, tudi maligna transformacija*	Celična transformacija je <i>in vitro</i> pretvorba oz. sprememb normalnih evkariontskih celic v nenormalno rastoče celice podobne tumorju. S transformacijo celica pridobi sposobnost nenadzorovanega pomnoževanja in postane nesmrtna.
Celični označevalci	Celični označevalci so receptorji, ki selektivno vežejo signalne molekule. Vsaka celica ima na površini kombinacijo receptorjev, po čemer se loči od ostalih celic. Slednje omogoča specifično identifikacijo celic.
Diferenciacija*	Diferenciacija celic je proces, v katerem se manj specializirane celice razvijejo v specializirane celične tipe. Pri tem pride do sprememb genske ekspresije, fiziologije celic in njihove oblike. Pri diferenciaciji se zmanjša tudi sposobnost samoobnavljanja.
Fetalni goveji serum* (FBS)	Običajen dodatek k mediju za gojenje celic, ki se pridobiva iz seruma nerojenih telet (FCS, » <i>Fetal Calf Serum</i> «). Vsebuje različne rastne dejavnike.
Glioblastom multiforme (GBM)	Glioblastom multiforme, ki je znan tudi kot astrocitom IV. stopnje. Gre za najbolj maligno obliko gliomov, ki

	lahko nastane preko prehodno manj malignih vrst astrocitomov ali neposredno.
Gliom*	Tumor, ki se razvije iz glia celic, med katere prištevamo ependimalne celice, oligodendrocite in astrocite ter celice mikroglia.
In vitro*	V epruveti oziroma v umetnem okolju.
Konfluenca*	Stopnja preraščenosti (izražena v %) dna gojilne posodice s celicami. Če so celice konfluentne pomeni, da so popolnoma prerasle dno posode.
Kostni mozeg*	Mehko tkivo, ki se nahaja v dolgih kosteh. V kostnem mozgu poteka hematopoeza. Kostni mozeg vsebuje zraven različnih odraslih celic tudi več vrst matičnih celic, npr. mezenhimske, krvotvorne in druge matične celice.
Krvotvorna matična celica, tudi hematopoetska matična celica*	Krvotvorna matična celica ali hematopoetska matična celica (KMC) je multipotentna matična celica, iz katere nastajajo vse krvne celice, tako mieloične (monociti, makrofagi, granulociti, rdeče krvničke, megakariociti/krvne ploščice) kot limfocitne celice (limfociti T in B, naravne celice ubijalke). Glede na to delimo KMC na multipotentne matične celice mieloične vrste (MMC-M) ter multipotentne matične celice limfocitne vrste (MMC-L).
Matična celica*	Nespecializirana celica zarodka ali odraslega organizma, ki ima sposobnost neomejene samoobnove, plastičnosti in diferenciacije v specializirane celice.
Matična celica odraslega (sin. Somatska matična celica, tkivna matična celica)*	Nediferencirana matična celica, ki jo v majhnem številu najdemo v različnih tkivih in organih odrasle osebe. Do določene mere ima sposobnost samoobnavljanja in ustvarjanja potomk, ki se diferencirajo v specializirane celice tega tkiva oz. organa. Poznanih je več tipov teh celic.
Matičnost*	Sposobnost vzdrževanja pluripotentnosti navkljub delitvam. Matične celice vzdržujejo matičnost s pomočjo aktivnega izražanja določenih genov in s specifičnimi celičnimi mehanizmi.
Mezodermalni diferenciacijski potencial	Sposobnost razvoja v celice mezodermalnih tkiv– hrustančne celice, kostne celice, kite, maščobe celice, mišične in srčno-mišične celice in stromalne celice.
Možganska tumorska matična celica (angl. Brain tumour stem cell)	Možganske tumorske matične celice so zelo tumorigena subpopulacija gliomskih celic. Možganske tumorske matične celice so odporne na zdravljenje in na celični površini izražajo celični antigen CD133.
Mezenhimska matična celica - MSC (angl. Mesenchymal stem cells)	Mezenhimske matične celice so multipotentne celice sposobne samoobnove. Lahko se diferencirajo v različne celice mezenhimskih tkiv (kostno, hrustančno, mišično,

	maščobno tkivo in vezivno tkivo tetiv). Pokazalo se je, da so celice MSC v <i>in vitro</i> pogojih sposobne tudi transdiferenciaciji, ki vodi v nastanek celic visceralnega mezoderma, nevroektoderma in endoderma.
Multipotentna matična celica	Celica z manjšo/ožjo sposobnostjo diferenciacije kot pluripotentna in totipotentna matična celica. Multipotentna celica lahko tvori različne tipe celic, ki pa vsi pripadajo isti liniji. Večina tkivno specifičnih matičnih celic iz odraslih tkiv je multipotentnih.
Niša*	Celično mikrookolje, ki nudi podporo in nujno potrebne dražljaje za ohranjanje samoobnovitvenega potenciala.
Pasaža*	Presaditev celic v celični kulturi; ponavadi presaditev opravimo, ko celice v kulturi dosežejo konfluentno stanje.
Plastičnost*	Sposobnost matičnih celic, da se razvijejo v celice različnih, nesorodnih tkiv.
Pluripotentna matična celica*	Matična celica, ki se lahko diferencira v celice vseh treh kličnih plasti.
Podvojitveni čas	Obdobje v katerem se začetno število celic podvoji.
Predniška celica, tudi usmerjena matična celica*	Direktna potomka matične celice, iz katere nastanejo nove celice po seriji celičnih delitev. V človeškem telesu se iz predniške celice razvije več kot 200 različnih celičnih tipov.
Proliferacija*	Podvajanje celic in njihov razvoj.
Samoobnavljanje, samopomnoževanje*	Proces značilen za matične celice, v katerem po celični delitvi nastane hčerinska celica, ki je popolnoma enaka materinski. Hčerinska celica ima enako sposobnost diferenciacije kot celica, iz katere je nastala. Vzdrževanje matičnosti je rezultat sodelovanja številnih mehanizmov in izražanja pluripotentnih genov. Celična delitev je ponavadi asimetrična in zato se druga potomka lahko usmeri v določeno razvojno pot.
Senescenca	Senescenca je celični proces, ki povzroča zmanjšano stopnjo delitve celic, akumulacijo metabolnih produktov ali celično smrt.
Stromalne celice kostnega mozga*	Mešana populacija mezenhimskih matičnih celic in drugih nekrvotvornih celic v kostnem mozgu. Stromalne celice v kostnem mozgu tvorijo nišo matičnih celic, s čimer spodbujajo njihovo rast in razvoj. Stromalne celice kostnega mozga spodbujajo tudi rast krvnih celic prednic.
Totipotentna matična celica*	Matična celica zmožna diferenciacije v vse celične vrste (teh je pri človeku več kot 200), tudi v spermije in oocite.
Transdeterminacija*	Proces, pri katerem se predniške matične celice ene usmeritve spremenijo v celice druge predniške usmeritve (npr. nastanek ektodermalnih prednic iz mezodermalnih celic).

Transdiferenciacija*	Proces, pri katerem se tkivne matične celice iz enega tkiva odraslega osebka spremenijo (oz. diferencirajo) v specializirane celice drugega tkiva. Transdiferenciacija je naraven pojav in je eden od mehanizmov plastičnosti matičnih celic.
Tumorigeneza	Proces nastanka tumorja in raka.
Tumorska matična celica	Tumorska matična celica je tista tumorska celica, ki ima sposobnost samoobnove in asimetrične delitve. Pri asimetrični delitvi nastane tumorska progenitorska celica, ki je vir malignega fenotipa.
Unipotentna matična celica*	Celica, ki je sposobna le razvoja v eno celično linijo.
Živčne matične celice (angl. Neural stem cell)	Tkivno specifične matične celice značilne za centralni živčni sistem. Nahajajo se v posebnih možganskih regijah, predvsem v subventrikularni coni sprednjih lateralnih ventriklov in v <i>gyrus dentatus</i> hipokampusa. Sposobne so diferenciacije v nevrone in podporne glia celice.

* Rožman in Jež, 2009

1 UVOD

Rak je takoj za kardiovaskularnimi boleznimi drugi najpogosteji vzrok smrti v razvitem svetu. Kljub intenzivnim raziskavam na področju njihovega zdravljenja, za nekatere oblike tumorjev še ne poznamo učinkovitih terapevtskih metod. Še posebej težavno je obravnavanje visoko invazivnih in infiltrativnih oblik tumorjev kot so na primer glioblastomi.

Trenutno pri terapiji neozdravljenih tumorjev največ obetajo strategije, ki vključujejo aplikacijo človeških mezenhimskega matičnega celic (hMSC). Prav zato se v okviru celične terapije večina raziskav na tem področju osredotoča na multipotentne celice, ki bi delovale kot dostavni sistem za zdravila. Znano je, da med celicami MSC in tumorskimi celicami vladajo svojevrstne interakcije, ki bi jih z določenimi modifikacijami lahko izkoristili v prid zdravljenja raka.

Preden bi celice MSC dejansko bile varne in učinkovite za uporabo, je potrebno raziskati in predvideti tudi vse negativne plati njihove uporabe. Po drugi strani pa je potrebno pojasniti tudi biologijo rakavih celic, ki so hierarhično organizirane in kjer je le peščica rakavih celic dejansko odgovorna za iniciacijo in metastaziranje tumorja.

V diplomski nalogi smo se osredotočili na celice MSC iz kostnega mozga. Tem celicam smo določali proliferacijsko in diferenciacijsko kapaciteto pri dolgotrajnem *in vitro* gojenju, saj nas je zanimalo, kako se spremenijo lastnosti celic MSC, ki odločilno vplivajo na njihovo uporabo v celični terapiji. Z našim poskusom smo ugotovljali tudi vpliv celic MSC na samo proliferacijo glioblastomskih matičnih celic. Zanimalo nas je ali so celice MSC sposobne zavirati/spodbujati proliferacijo zelo tumorigene subpopulacije glioblastomskih celic CD133+, možganskih tumorskih matičnih celic (BTSC).

2 PREGLED OBJAV

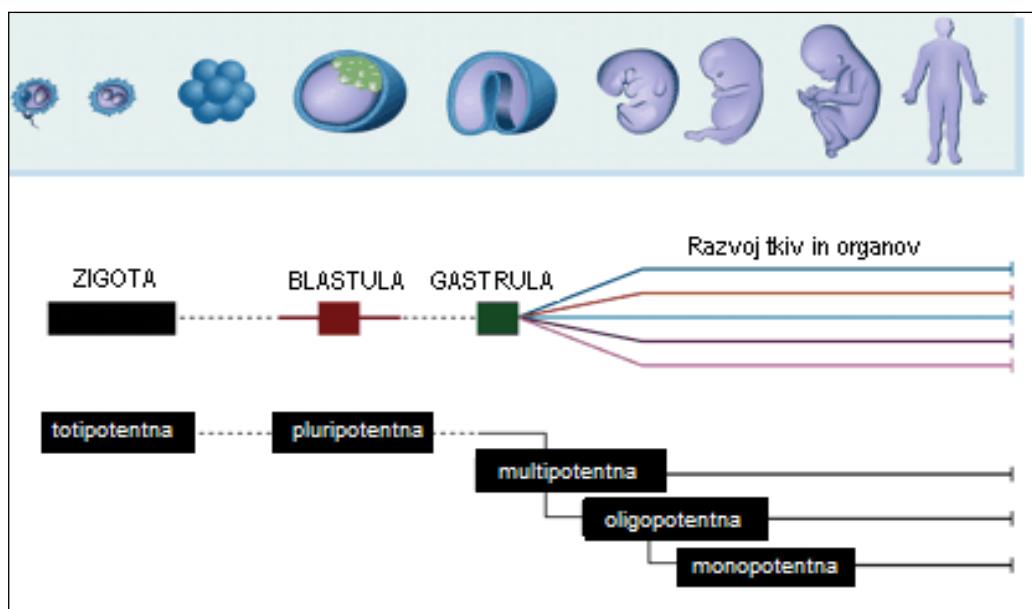
2.1 MATIČNE CELICE

Matične celice (angl. *stem cells*) so posebna, redka populacija celic, ki se ohranjajo v telesu vse življenje. Najdemo jih v vseh tkivih odraslega človeka, kjer skrbijo za tkivno homeostazo - obnovo tkiv in nadomeščanje odmrlih celic pri popravljanju tkivnih poškodb (Meng in sod., 2007). Matične celice so nediferencirane celice, ki so zmožne dolgotrajnega asimetričnega deljenja, pri čemer je ena izmed nastalih hčerinskih celic identična kopija materinske, druga pa je usmerjena v diferenciacijo specifične tkivne celice. Proses tvorbe celic z enakim diferenciacijskim potencialom kot ga imajo materinske celice iz katerih so nastale, imenujemo samoobnavljanje (Strbad in Rožman, 2005; Zipori, 2005).

Glede na sposobnost diferenciacije delimo matične celice v štiri skupine: totipotentne, pluripotentne, multipotentne in unipotentne matične celice. *Totipotentne matične celice* se

lahko diferencirajo v vsa embrionalna in izvenembrionalna tkiva. Takšna je celica zigote, nastala po združitvi spermija in jajčeca, ki lahko tvori cel organizem. Za pluripotentne matične celice je značilno, da se lahko diferencirajo v celice vseh treh celičnih plasti – mezoderma, ektoderma in endoderma, ne morejo pa se diferencirati v trofoblast, ki tvori izvenembrionalna tkiva. Zato pravimo, da se pluripotentne matične celice lahko diferencirajo v vse celične tipe odraslega organizma (Zipori, 2005).

Med *pluripotentne matične celice* prištevamo embrionalne matične celice, inducirane matične celice dobljene pri reprogramiranju že diferenciranih celic (IPs) in mezenhimske (stromalne) matične celice. *Multipotenten potencial* pa imajo matične celice odraslih ljudi, matične celice v amniotski tekočini in usmerjene progenitorske celice (Yu in Estrada, 2010). *Unipotentne matične celice* so tkivno specifične in se lahko razvijejo v eno celično linijo, od somatskih celic jih loči le sposobnost samoobnavljanja (Strbad in Rožman, 2005).



Slika 1: Spremljanje diferenciacijskega potenciala matičnih celic med razvojem osebka. V različnih razvojnih stopnjah osebka se pojavijo matične celice z različnim razvojnim potencialom. Z razvojem v bolj zrele celice se sposobnost diferenciacije zmanjšuje (Zipori, 2005).

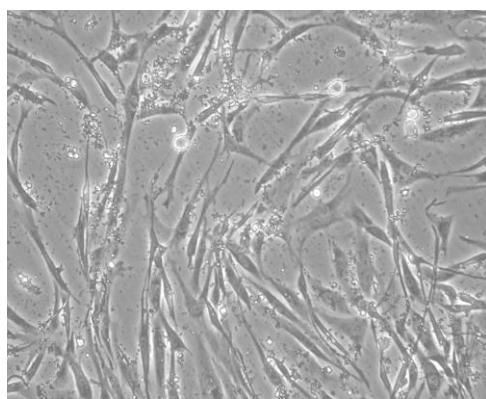
Pomembna lastnost matičnih celic je tudi plastičnost. Definirana je kot sposobnost matičnih celic, da se kot odgovor na fiziološke dražljaje diferencirajo v celice drugih tkiv, ne le v celice tkiva iz katerega izhajajo (Strbad in Rožman, 2005; Zipori, 2005). K plastičnosti prištevamo tudi odzivnost matičnih celic na fiziološke dražljaje v mikrookolju. Pri zamenjavi njihovega naravnega okolja z novim, *in vitro* mikrookoljem, se matične celice prilagodijo na spremembo in pridobijo lastnosti, ki ustrezajo novim fiziološkim pogojem. K plastičnosti matičnih celic sodijo štirje procesi: dediferenciacija (razvoj celice v prvobitnejšo obliko), transdeterminacija (preskok med dvema progenitorskima celičnima linijama), transdiferenciacija (že diferencirana celica pridobi lastnosti druge diferencirane celice) in sposobnost fuzije z že diferenciranimi celicami (nastanek novega celičnega tipa) (Rendon in Watt, 2003).

2.1.1 Mezenhimske matične celice (MSC)

V preteklosti je za mezenhimske matične celice - celice MSC (angl. »*Mesenchymal Stem Cells*«) veljalo, da imajo multipotentni diferenciacijski potencial, saj se pod ustreznimi eksperimentalnimi pogoji (*in vitro* in *in vivo*) lahko razvijejo v različne celice mezodernalne linije (osteoblaste, hondroblaste in adipocite) (Pittenger in sod., 1999; Bianco in sod., 2001). Novejša odkritja so pokazala, da imajo celice MSC pod določenimi pogoji pluripotentni potencial. Tako so v *in vitro* pogojih sposobne transdiferenciacije, ki vodi v nastanek celic visceralnega mezoderma, nevroektoderma in endoderma (Jiang in sod., 2002). Transdiferenciacija celic MSC v *in vivo* pogojih pa še ni potrjena. Novejše raziskave nakazujejo, da se sistemsko aplicirane celice MSC lahko razvijejo v številne celične tipe, vendar podrobnosti teh mehanizmov niso znane. Predvideva se, da prihaja do transdiferenciacije, dediferenciacije, združitve z drugimi celicami ali kombinacije teh mehanizmov (Kallis in sod., 2007).

Glavni vir celic MSC je kostni mozeg, izolirati pa jih je možno tudi iz drugih tkiv in organov (maščobno in mišično tkivo, organi fetusa, možgani in zobje). V kostem mozgu predstavljajo celice MSC (ang. BM-MSC) redko celično populacijo, njihova zastopanost je med 0,001% in 0,01%. Starost darovalca je eden pomembnejših dejavnikov prisotnosti celic BM-MSC v kostnem mozgu. Iz starejših darovalcev lahko izoliramo manj celic MSC (Rao in Mattson, 2001).

Morfološko celice MSC opisujemo kot podolgovate, fibroblastom podobne celice (Pittenger in sod., 1999). Uvrščamo jih med stromalne celice kostnega mozga, ki imajo dvojno vlogo: a) so matične celice za nekrvotvorna tkiva in niše regenerativnih celic vseh tkiv in hkrati b) predstavljajo hrnilne celice za podporo rasti in diferenciacije krvnih celic, ker so zmožne sinteze različnih komponent zunajceličnega matriksa in rastnih faktorjev. Zaradi sposobnosti tvorbe niš krvotvornih matičnih celic, so celice MSC pomembne tudi pri transplantacijah (Locatelli in sod., 2007).



Slika 2: Mezenhimske matične celice v kulturi. V kulturi so celice MSC heterogene, imajo različno dinamiko rasti in različno morfologijo. V gojitvenih posodicah je moč videti vretenaste, fibroblastom podobne celice, poleg njih pa še velike sploščene celice (Fazni kontrast, 100-kratna povečava, Strbad, 2004).

2.1.1.1 Lastnosti celic MSC

Celice MSC so v *in vitro* pogojih kompaktne, vretenaste oblike in imajo orientirano rast. Pritrujejo se na podlago in rastejo v monosloju, kar olajša njihovo izolacijo. Ko zapolnijo dostopno površino se kot posledica kontaktne inhibicije ustavi njihova rast. Na tej stopnji je celice MSC potrebno presaditi. S presajanjem tudi zmanjšujemo heterogenost celične populacije (Jackson in sod., 2007).

Celice MSC določamo s površinskimi antigeni oziroma s celičnimi označevalci in s preverjanjem njihovega pluripotentnega diferenciacijskega potenciala. Celični označevalci so molekule na površini celic, ki jih imenujemo molekule CD (angl. *Clusters of Differentiation*) (Bernard in Boumsell, 1984). Za izolacijo homogene populacije celic MSC uporabljamo določene kombinacije celičnih označevalcev, ker za neposredno identifikacijo matičnih celic specifični označevalci še ni definiran. Celice MSC so negativne za krvotvorne označevalce CD14, CD34, CD45, pozitivne pa so za številne molekule za pritrjevanje, npr. CD73, CD90, CD105, CD166 (Locatelli in sod., 2007). Za izolacijo celic MSC iz kostnega mozga uporabljamo še naslednje označevalce: CD13, CD29, CD31, CD44, CD54, CD63, CD106, CD140b, in Stro-1. Celične frakcije izolirane glede na prisotnost celičnega označevalca CD133 (prominin-1) vsebujejo celice MSC z visokim proliferacijskim potencialom. Molekule CD133 zato uvrščamo med označevalce zgodnjih progenitorskih celic, tako krvotornih kakor tudi mezenhimskih matičnih celic (Tondreau in sod., 2005). Za celice MSC je značilno šibko izražanje HLA molekule razreda I, ne izražajo pa HLA molekul razreda II (Jackson in sod., 2007).

Preglednica 1: Najpogosteji celični označevalci celic MSC iz kostnega mozga (Pernick, 2010).

Okrajšava celičnega označevalca	Ime označevalca	Fiziološki pomen označevalca
CD133	Aka prominin-like 1, AC 133	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Uporablja se za selekcijo hematopoetskih matičnih in progenitorskih celic pri transplantacijah. ▪ Nahaja se na mikrovilnih in ostalih membranskih izboklinah.
CD73	ekto-5'-nukleotidaza	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Katalizira defosforilacijo ribo- in deoksiribonukleotidov na nukleozide. ▪ Sodeluje pri aktivaciji celic T, pritrjanju limfocitov na dendritične celice in endotelij. ▪ Deluje protivnetno in zavira tvorbo intime. ▪ Sodi med označevalce zorenja limfocitov.

se nadaljuje

nadaljevanje

Okrajšava celičnega označevalca	Ime označevalca	Fiziološki pomen označevalca
CD105	endoglin	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Regulatorna komponenta TGF-beta receptorskega kompleksa. ▪ Označuje celice, ki sodelujejo pri začetnih stopnjah hematopoeze. ▪ Uporablja se kot specifični in občutljivi označevalec angiogeneze tumorjev.
CD166	angl. » <i>Aka Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule</i> « (ALCAM)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Adhezijska molekula, veže se na CD6. ▪ Sodeluje pri podaljševanju nevronskih nevritov, hematopoezi in angiogenezi med embrionalnim razvojem.
CD90	Thy-1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sodeluje pri diferenciaciji hematopoetskih matičnih celic in tvorbi sinaps v CŽS. ▪ V kombinaciji z označevalcem CD34 določa hematopoetske celice, ki se uporabljajo za avtologne transplantacije pri malignih obolenjih kostnega mozga. ▪ Sodeluje pri pritrjanju belih krvničk na aktivirane endotelijske celice.
CD13	Aminopeptidaza N (APN)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Peptid, ki cepi encime tankega črevesa, ledvičnih proksimalnih tubulov in placente. ▪ Cepi peptide antigena, ki je vezan na predstavitev celicah MHC razreda II. ▪ V sinaptičnih membranah v CŽS razgrajuje nevrotransmiterje na sinaptičnem stiku.
CD29	integrin beta-1 (ITGB1), fibronektinski receptor podenote beta, VLA (CD49) beta veriga	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Skupaj s CD49a tvori receptor kolagena in laminina, ki sodeluje pri povezovanju celic, vnetnih procesih in fibrozi. ▪ Glede na prisotnost liganda lahko spodbuja ali zavira apoptozo.
CD31	angl. » <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i> «, PECAM-1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Celična adhezijska molekula, ki pod vnetnimi pogoji sodeluje pri migraciji levkocitov preko endotelija.
CD44	Kadherin 5, tip 2 ali VE-kadherin (angl. » <i>vascular endothelial</i> «)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sodi v družino površinskih glikoproteinov s številnimi izoformami in posttranslacijskimi modifikacijami, zlasti glikozilacijami. ▪ Pomemben je pri pritrjanju celic in vzdrževanju celične polarnosti, spodbuja tudi celično proliferacijo in migracijo.

se nadaljuje

nadaljevanje

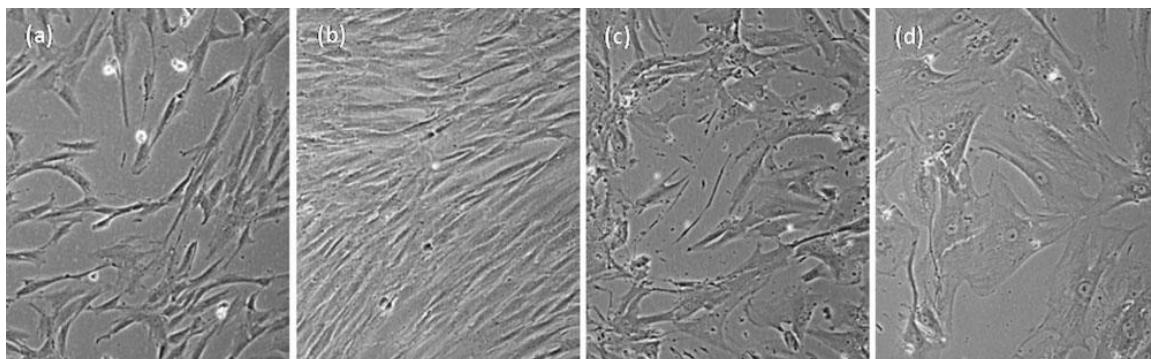
Okrajšava celičnega označevalca	Ime označevalca	Fiziološki pomen označevalca
140b	PDGF receptor beta (angl. »Aka beta platelet derived growth factor receptor«)	<ul style="list-style-type: none"> Kot rastni faktor regulira rast in delitev celic. Pomemben je zlasti pri tvorbi novih krvnih žil, ki so značilne za tumorsko tvorbo.
CD54	ICAM-1 (angl. «intercellular adhesion molecule 1»)	<ul style="list-style-type: none"> Sodeluje pri vnetnih procesih. Zmanjšano izražanje v endometijskih celicah lahko vodi v endometriozo.
CD63	NKI-C3, LAMP-3 (angl. »lysosomal membrane-associated glycoprotein 3«), ME491 (z melanomom povezan antigen)	<ul style="list-style-type: none"> Sodi med tetraspanine, integralne membranske proteine, ki sodelujejo pri celičnem signaliziranju, migraciji in morfologiji. Najdemo ga v lizosomih in endosomih nevtrofilcev. Predstavlja označevalec aktiviranih trombocitov in regulira razširjanje trombocitov na imobiliziranem fibrinogenu. Povezujemo ga z zgodnjimi stopnjami napredovanja melanomov.
CD106	VCAM-1 (angl. »vascular cell adhesion molecule 1«); alfa 4 beta 1 ligand	<ul style="list-style-type: none"> Sodeluje pri migraciji levkocitov. Določa revmatično bolezen tipa II. Pomemben je pri iniciaciji ateroskleroze. Pri raku na prsih je njegovo zmanjšano izražanje znak metastaziranja v vozliščih.
Stro-1	Angl. »Simmons and Torok-Storb receptor«	<ul style="list-style-type: none"> Površinski celični protein na stromalnih celicah kostnega mozga in eritroidnih prekurzorjih. Celice kostnega mozga, ki izražajo antigen STRO-1 so sposobne diferenciacije v celice različnih mezenhimskih linij - v hematopoetsko podporne stromalne celice, adipocyte, osteoblaste in hondrocyte.

2.1.1.2 Proliferacija celic MSC

Proliferacijske lastnosti vseh celic MSC niso enake – razlikujejo se glede na tkivo in starost donorja iz katerega so pridobljene. Tako imajo celice MSC izolirane iz kostnega mozga daljši podvojitveni čas (30-60 ur) kot celice MSC, ki izvirajo iz popkovnične krvi (20-30 ur) (Gang in sod., 2004; Nakamizo in sod., 2005; Lu-Lu in sod., 2006). Podvojitveni čas je obdobje v katerem se začetno število celic podvoji. Celice MSC izolirane iz starejših donorjev imajo nižji proliferacijski in diferenciacijski potencial ter

hitreje preidejo v senescenceno. Na lastnosti celic MSC poleg starosti donorja močno vpliva tudi postopek izolacije iz določenega tkiva (Kern in sod., 2006) in mikrookolje v izvornem tkivu (Gang in sod., 2004).

Tudi med *in vitro* gojenjem se lahko lastnosti celic MSC dodatno spremenijo. Podvojitetni časi se pričnejo podaljševati, spreminja se morfologija celic in zmanjša se njihova diferenciacijska sposobnost (Gang in sod., 2004; Nakamizo in sod., 2005). Povprečni podvojitetni čas celic MSC se precej hitro podaljša, iz začetnih 30 ur v primarni kulturi na kar 380 ur že pri pasaži 5 (Banfi in sod., 2000). Močno zmanjšanje proliferativne kapacitete celic MSC gojenih več kot 10 pasaž je najbrž povezano s spontanim nastopom apoptoze, saj se takrat poveča izražanje z apoptozo povezanih genov FasL in perforina. Spremeni se tudi videz celic. Celice MSC nižjih pasaž so podolgovate oblike in spominjajo na fibroblastne celice. Kasneje, pri višjih pasažah, se povečajo in so bolj sploščene (Lim in sod., 2006).



Slika 3: Morfološke spremembe celic MSC pri daljšem *in vitro* gojenju. (a in b) Celice MSC zgodnjih pasaž (pasaža 5) so vretenaste oblike in tvorijo konfluentno celično kulturo. (c) Po pasaži 18 so celice na predsenescentni stopnji in postajajo sploščene oblike. (d) Obdobje med pasažama 18 in 23 je zaznamovano z obsežno celično smrto, prezivele senescentne celice se prenehajo deliti (Motaln in sod., 2010).

Razlike v proliferaciji so lahko tudi posledica spremenjenih *in vitro* pogojev. Tako se v hipoksičnih pogojih (ko je vsebnost kisika omejena na 5% namesto 21%) proliferacija celic MSC poveča. Ob zmanjšani vsebnosti kisika se celice MSC lahko spontano diferencirajo v hondrocite (Warnawin in sod., 2005). Nasprotno pa stopnja konfluence pri precepljanju celic ne vpliva na proliferativne lastnosti in pričakovano življenjsko dobo celic (Stenderup in sod., 2003).

Tudi v diplomski nalogi smo spremljali proliferacijo *in vitro* gojenih celic MSC izoliranih iz dveh različnih donorjev. Ukvvarjali smo se z morfologijo celic MSC, saj so nas zanimale morebitne spremembe videza celic pri podaljšanem *in vitro* gojenju.

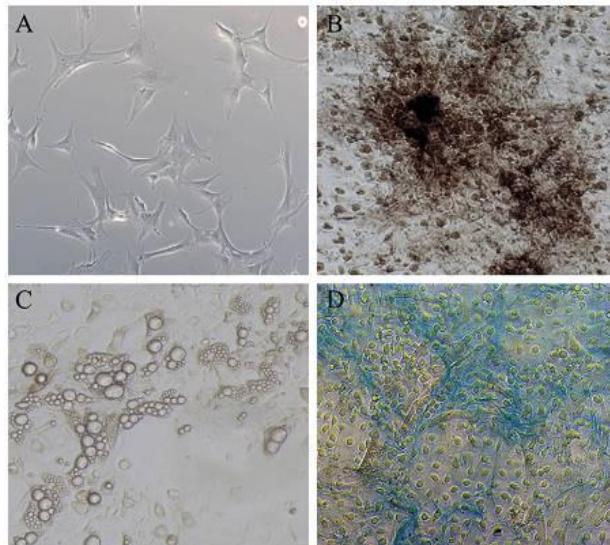
2.1.1.3 Diferenciacija celic MSC

Celice MSC *in vitro* vzdržujemo v nediferenciranem stanju z ustreznimi rastnimi dejavniki in citokini. Diferenciacijo celic MSC lahko poljubno usmerjamo v hrustančne, kostne, maščobne in mišične celice ter celice vezivnega tkiva (Pittenger in sod., 1999). Zaradi zmožnosti transdeterminacije, sposobnosti preskoka iz mezodermalne v ektodermalno zarodno plast, je celice MSC možno diferencirati v srčno-mišične in živčne celice (npr. v

astrocite in nevrone) (Strbad in Rožman, 2005). V vseh signalnih poteh, ki vodijo diferenciacijo celic MSC do določenega celičnega tipa, najdemo specifične rastne faktorje. Tako je za uspešno adipo-, hondro- in osteogenezo nujna prisotnost TGF- β , PDGF in FGF rastnih faktorjev (Ng in sod., 2008).

Pri diferenciaciji celic MSC v različne celične tipe opazimo, da obstajajo preference za določeno pot diferenciacije. Najlažje dosežemo adipogeni fenotip (nastanek maščobnih celic z intracelularnimi maščobnimi vakuolami), nasprotno pa hondrogena diferenciacija (nastanek hrustančnih celic) težje poteka (Kern in sod., 2006). S spremembo pogojev gojenja, npr. z izpostavljivijo celic hipoksičnim razmeram dosežemo, da tudi hondrogena diferenciacija poteka neoteženo (Warnawin in sod., 2005).

Pomemben dejavnik uspešne diferenciacije celic MSC je dolžina časovne periode njihovega *in vitro* gojenja. Celice MSC začetnih pasaž razmeroma enostavno diferenciramo v maščobne in kostne celice. Nasprotno pa je pri celicah MSC višjih pasaž (že pri pasaži 10) fenotip kostnih celic težje doseči. Adipogena diferenciacija uspešno poteka tudi pri višjih pasažah, vendar so takrat nastale maščobne vakuole manjše (Lim in sod., 2006; Stenderup in sod., 2003).



Slika 4: Multipotentni diferenciacijski potencial mezenhimskih matičnih celic (MSC). Nediferencirane celice MSC rastejo v monosloju (A). Po izpostavitvi specifičnim dejavnikom se celice MSC diferencirajo v osteocite (B), adipocyte (C) in hondrocite (D) (Chen in sod., 2008).

2.1.1.4 Senescenca

Replikativna senescenca je definirana kot irreverzibilna izguba proliferativne sposobnosti celic, ki ogroža preživetje celic. Senescenco povzroča več dejavnikov: krašanje telomer, DNA poškodbe, izražanje onkogenov in spremembe oz. razpad kromatina. Za senescentno celico je značilno, da navkljub prisotnosti mitogenih signalov ne vstopi v S fazo celičnega cikla, ampak obtiči v G1 fazni (Gatza in sod., 2005). Med senescencijo je nabor izraženih genov drugačen kot pred njenim nastopom. Pojavijo se tudi kromosomske aberacije in

krajšanje telomer. Pri zgodnih pasažah se telomere skrajšajo za 100 baznih parov pri vsaki podvojitvi populacije. Telomere v celicah poznejših pasaž so kraje že za okrog 3000 bp. S senescenco povezane pataloške spremembe (npr. nezmožnost regeneracije tkiva) imenujemo fenotip staranja (Stenderup in sod., 2003).

Omejenost replikativne sposobnosti celic je znana kot »*Hayflickova limita*«. Življenjsko dobo *in vitro* gojenih celic po Hayflickovem modelu staranja celic razdelimo na tri faze. Prva je stopnja hitre celične rasti, takrat imajo celice pred seboj še več kot 50% življenjske dobe. Rast celične kulture se upočasni, ko celice dosežejo 50-80% pričakovane življenjske dobe. V zadnji fazi nastopi senescenca in celična rast se ustavi. Takrat so celice prešle 80% pričakovane življenjske dobe. Celice prve faze dojemamo kot »mlade«, celice tretje pa z dodatnim upoštevanjem morfoloških, biokemičnih in molekularnih kazalcev imenujemo »senescentne«. Večina celic odraslega človeka se lahko deli največ 50 do 60-krat preden postanejo senescentne (Stenderup in sod., 2003). Nekatere celice MSC ne vstopijo v senescenco niti po 30 pasažah oz. celo 3 do 4 mesece (Gang in sod., 2004; Kern in sod., 2006; Bernardo in sod., 2007; Wagner in sod., 2008).

Fenotip staranja srečamo tudi pri celicah MSC, ki spremenijo vzorec izražanja genov. Celice MSC poznejših pasaž povečajo izražanje tumor supresorskih genov (p16, p21, p53, Rb ter kaveolina), s čimer se spremeni odzivnost na rastne faktorje (Shibata in sod., 2007). Zmanjšanje proliferacijskega potenciala celic MSC verjetno povzročajo tudi metilacija promotorske regije gena p16 (INK4A) in kromosomske aberacije (Shibata in sod., 2007). Približno 30% senescentnih celic MSC ima trisomijo kromosoma 8 (Rubio in sod., 2005). Po pasaži 20 celice MSC postanejo poliploidne (večinoma tetraploidne), kasneje tudi aneuploidne (Izadpanah in sod., 2008). Med senescencijo se spremeni tudi videz celic. Celice postanejo bolj okrogle in imajo večjo plazmatsko membrano. V celični citoplazmi se pojavijo granule in inkluzijska telesca. V kulturi opazimo več celičnega drobirja (Wagner in sod., 2008).

Specifični mehanizmi, ki vodijo staranje celic MSC, danes še vedno niso pojasnjeni. Vemo pa, da oksidativne poškodbe, nivo ROS, p21 in p53 nedvomno prispevajo k staranju celic (Stolzing in sod., 2008). Senescenca je pravzaprav mehanizem odgovora na stres, saj z upočasnjeno ali prekinjeno celično delitvijo celice zavirajo lastno neoplastično transformacijo.

Za dokaz senescence celičnih linij se najpogosteje poslužujemo merjenja aktivnosti β -galaktozidaze (Shibata in sod., 2007). Funkcija encima β -galaktozidaze v senescentnih celicah ni povsem razjasnjena, vendar domnevamo, da je povezana s povečanjem aktivnosti lizosomov in spremenjenim, znižanim pH citosola med celičnim staranjem (Stenderup in sod., 2003).

Zmanjšanje proliferacijske kapacitete in z njo povezana senescenca celic sta iz vidika uporabnosti celic MSC v terapevtske namene izredno neugodna procesa. Uspešna *ex vivo* ekspanzija celic je namreč predpogoj za pridobitev zadostnega števila celic za nadaljne *in vitro* tkivno inženirstvo in uporabo v celični terapiji.

2.1.1.5 Gojenje celic MSC

Za ohranjanje primernega proliferacijskega in diferenciacijskega potenciala celic MSC je pomembna ustrezna izbira medija za njihovo gojenje. Za vzdrževanje celičnih kultur se najpogosteje uporablja DMEM osnovni medij (angl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Nakamura in sod., 2008). Poleg aminokislin DMEM medij vsebuje tudi soli (kalcijev klorid, natrijev klorid, magnezijev sulfat, natrijev klorid in mononatrijev sulfat), glukozo, vitamine (folna kislina, nikotinamid, riboflavin in vitamin B₁₂), železo in barvilo fenol rdeče. Veliko pozornost je potrebno nameniti tudi lastnostim podlage za gojenje celic, saj te vplivajo na pritrjevanje in razmnoževanje celic MSC po izolaciji (Sotiropoulou in sod., 2006).

Vse sestavine medija, predvsem pa njihova kakovost, stabilnost in primerna količina so ključnega pomena za uspešno izolacijo, gojenje in rast v *in vitro* pogojih. Medij ponavadi vsebuje serum, ki zagotavlja optimalno rast celic MSC. Najprimernejši je 10- ali 20- odstotni dodatek fetalnega govejega seruma (FBS) ali pa 10- odstotni avtologni serum (AS). Pri primerjalnem gojenju celic MSC v mediju z 10% FBS in v mediju z 10% AS ni opaziti bistvenih razlik. V obeh primerih imajo celice MSC podobno morfologijo, rastni profil, diferenciacijski potencial in nabor celičnih označevalcev (Stute in sod., 2004).

Pri sestavi gojišča za celice MSC moramo biti pozorni na koncentracijo glukoze. Preveč glukoze povzroči nabiranje laktata, veliko porabo hrani in zato zmanjšano aktivnost celic. Posledično prihaja do prezgodnjega nastopa senescence in apoptoze (Sotiropoulou in sod., 2006).

2.1.1.6 Spontana transformacija celic MSC

Večina celic MSC ni nesmrtnih in razpolaga z omejenim številom celičnih delitev. V redkih primerih se pri dolgotrajnem, 4-5 mesečnem *in vitro* gojenju lahko zgodi, da se celični populaciji proliferacijski potencial ponovno poveča. Ta proces so sprva povezovali s transformacijo celic MSC v celice s tumorigenim potencialom (Rubio in sod., 2005).

Življenska doba *in vitro* gojenih človeških celic je odvisna od regulacije na dveh kontrolnih točkah, v senescenčni in krizni fazni. Celice, ki preživijo prvo senescenčno fazo (vanjo vstopijo po približno 20 *in vitro* populacijskih podvojitvah), rastejo vse do kritičnega skrajšanja telomer. Na tej stopnji se poveča izražanje onkogena c-myc, izražanje p16 pa se zmanjša (Rubio in sod., 2005). Znatno se zmanjša tudi izražanje gena p53 (Armesilla-Diaz in sod., 2009), ki je vpletjen v nastanek tumorjev. Sledi vstop v krizno fazo, za katero je značilna kromosomska nestabilnost in povečan obseg apoptoze. Le redkim kulturam uspe spontano preživetje te fazo. Potem pride do tumorigene transformacije in pojava populacije transformiranih mezenhimskih celic (TMC). Transformacijo spremišča povečanje telomerazne aktivnosti, delecija lokusa Ink4a/Arf in hiperfosforilacija Rb proteina (Rubio in sod., 2005, 2008).

Celice TMC imajo v primerjavi s celicami MSC, iz katerih se razvijejo, zmanjšano izražanje določenih membranskih označevalcev (CD34, CD90 in CD105). Spremeni se metabolizem v mitohondriih in DNA popravljalni mehanizmi. Naštete spremembe povzročajo, da celice izgubijo kontaktno inhibicijo. Celice TMC so tumorigene, saj po implantanciji v miših povzročajo nastanek fibrosarkomov. Vpliv celic TMC na modulacijo rasti in metastaziranje tumorja še vedno ni povsem pojasnjen (Rubio in sod., 2005). Spontano transformirane celice MSC privlačijo normalne celice MSC. Pojav označujemo s pojmom tropizem, kar pomeni, da stimulusi v celičnem mikrookolju usmerjajo migracijo celic. Celice TMC lahko celo fuzirajo z normalnimi celičnimi celicami MSC, s čimer se ponovno vzpostavi nemaligni celični fenotip. Nefuzirane transformirane celice pa še naprej delujejo kot rakave matične celice (Rubio in sod., 2008).

Zadnje čase spontano *in vitro* transformacijo celic dojemamo drugače, ker je vedno več dokazov, da se celice MSC pravzaprav ne transformirajo. Sprva so nekateri raziskovalci opazili, da jim tudi pri daljšem gojenju desetih različnih vzorcev celic MSC (do pasaže 25) transformacije celic ni uspelo doseči (Bernardo in sod., 2007). Novejše raziskave pa so pokazale, da je pojav hitro proliferajočih se celic, ki so jih nekateri doslej označevali za transformirane celice, posledica navzkrižne kontaminacije s drugimi celičnimi linijami. Analiza STR (angl. *Short Tandem Repeats*) oz. DNA fingerprinting domnevno transformiranih celic je pokazal, da izhodiščne celice MSC in celice, ki naj bi bile TMC, nimajo kompatibilnega profila. Zato se danes nagibamo k prepričanju, da se celice MSC spontano ne transformirajo ter da so v prejšnjih raziskavah bile spregledane navzkrižne kontaminacije z drugimi celičnimi linijami (Garcia in sod., 2010).

2.2 GLIOMI

2.2.1 Lastnosti rakavih celic

Normalne in rakave celice imajo zelo podobne mehanizme celične delitve, diferenciacije in apoptoze. Bistvena razlika rakave celice je nezmožnost pravilne regulacije teh procesov. Pri neoplazmah (novotvorbah) se srečujemo z nepravilno regulacijo štirih celičnih procesov (povzeto po Andreeff M. in sod., 2003):

- *celične proliferacije:* Mehanizmi zaviranja celičnih delitev so neučinkoviti, zato se celica neomejeno deli.
- *celične diferenciacije:* Rakave celice bodisi obtičijo na določeni diferenciacijski stopnji ali pa se diferencirajo v nenormalen celični tip.
- *organizacije kromosomov in genov:* Nestabilnost kromosomov in genov povzroča nastanek več različic določenega celičnega tipa. Nekaterim celicam se poveča gibljivost ali pa začnejo sintetizirati encime (proteaze), ki jim omogočajo invazivnost in metastaziranje.

- *programirane celične smrti – apoptoze:* Rakave celice pridobijo odpornost na apoptozo. Najpogosteje je vzrok temu okvara tumorsupresorskega proteina p53. Niz genetskih mutacij omogoča rakavim celicam izognitev nadzoru mnogih celičnih procesov. Prav zato imajo rakave celice spremenjeno fiziologijo, kažejo neodzivnost na zunanje signale in spodbujajo angiogenezo (Hanahan in Weinberg, 2000).

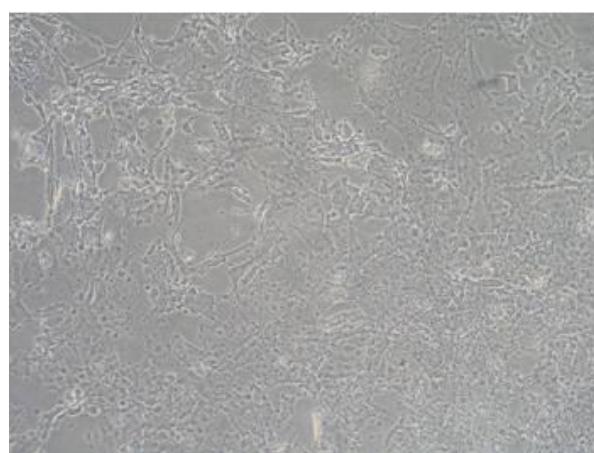
2.2.2 Možganski tumorji

Možganski tumorji centralnega živčnega sistema (CŽS) so druga najbolj pogosta neoplazma pri otrocih. Njihova pojavnost je visoka tudi v odrasli dobi, predvsem pri starejših ljudeh.

Glavna tipa celic v centralnem živčnem sistemu sta nevron in glia celica. Nevroni po diferenciaciji ne proliferirajo, nasprotno pa glia celice ohranijo sposobnost proliferacije. Prav zaradi te lastnosti smo sprva domnevali, da večina možganskih tumorjev izvira iz zrelih glia celic, v katerih je prišlo do kopiranja določenih mutacij. Danes pa je uveljavljeno prepričanje, da se velika večina možganskih tumorjev pravzaprav razvije iz nevralnih matičnih celic (NSC) (Wodarz in Gonzalez, 2006).

Glede na njihove lastnosti možganske tumorje delimo v dve veliki skupini. V prvo uvrščamo intrinzične tumorje oziroma tiste možganske tumorje, ki izvirajo iz nevroepitelijskega tkiva. V drugo skupino tumorjev sodijo vse ostale oblike znotrajlobanjskih neoplazem, ki pa ne nastanejo iz možganskega tkiva (Pribram, 1966).

Gliome, ki so najbolj pogosti tip intrinzičnega tumorja CŽS, ločimo glede na vrsto celic, iz katerih so nastali. Tako poznamo astrocitome (nastali iz astrocitov), oligodendrogliome (nastali iz oligodendrocytov) ter oligoastrocitome, ki so mešani in imajo morfološke lastnosti obeh (Wodarz in Gonzalez, 2006).



Slika 5: Primarna kultura glioblastomskih celic po petih dneh gojenja v NSC gojišču (Jin in sod., 2008).

2.2.3 Glioblastomi

Svetovna zdravstvena organizacija WHO (angl. *World Health Organization*) možganske tumorje razvršča v štiri skupine. Glavna razlika med stopnjami je hitrost napredovanja tumorjev in njihova odpornost na kemoterapijo, ki sta ključna dejavnika za prognozo bolezni. Tumorji WHO stopnje I so benigni in jih ob pravočasni diagnozi lahko kirurško odstranimo. Nasprotno tumorjev II, III in IV stopnje kirurško ne moremo popolnoma odstraniti (Belda-Iniesta in sod., 2006).

Najpogostejsi gliomi so glioblastomi, ki jih po merilih WHO uvršamo v IV., najbolj maligno skupino tumorjev. Tovrstni tumorji so odporni na kemoterapijo in povzročijo smrt v 9-12 mesecih (Belda-Iniesta in sod., 2006).

Preglednica 2: WHO stopnje možganskih tumorjev in čas preživetja (Belda-Iniesta in sod., 2006).

WHO stopnje	Preživetje v letih
Astrocytom	
Stopnja I (pilocitni astrocitom)	ozdravljen z operacijo
Stopnja II (astrocytom)	10-15
Stopnja III (anaplastični astrocitom)	2-3
Stopnja IV (glioblastom multiforme)	1
Oligodendrogliom	
Stopnja II (oligodendrogliom)	10-15
Stopnja III (anaplastični oligodendrogliom)	5-10
Mešani gliomi	
Stopnja II (mešani oligoastrocytom)	10-15
Stopnja III (anaplastični oligoastrocytom)	3-5

De novo nastale glioblastome imenujemo primarni glioblastomi. Sekundarni glioblastomi so rezultat malignega napredovanja astrocitnih tumorjev nižjih stopenj, z izjemo pilocitnih astrocitomov (Kleihues in sod., 2002). Primarni glioblastomi se razvijejo pri starejših bolnikih, med 50-im in 60-im letom starosti. Sekundarni glioblastomi, ki za razvoj iz manj malignih astrocitomov potrebujejo 5-10 let, so pogostejši pri mlajših pacientih (Belda-Iniesta in sod., 2006).

Genetske analize primarnih možganskih tumorjev so pokazale:

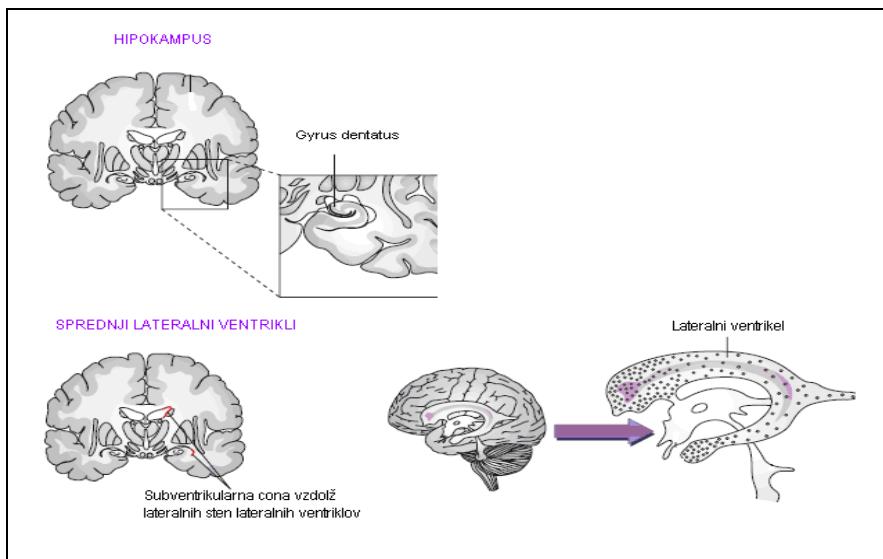
- Geni, ki nadzirajo celični cikel, so pogosto mutirani. Pri večini tumorjev je aktivnost CDK4 - kinaze, ki spodbuja celične delitve povečana za 30% (Reifenberger in sod., 1996).
- Povečano je izražanje mitogenov in njihovih membranskih receptorjev. Ti receptorji imajo aktivnost tirozinskih kinaz in uravnavajo znotrajcelično signalizacijo (Idema in Wesseling, 2007).

- Tumor supresorski geni (p53 in pRb) so pogosto izbrisani, hkrati pa je aktivirano izražanje onkogenov (Ras in Akt). Akt spodbuja proliferacijo celic in deluje kot dejavnik angiogeneze (Idema in Wesseling, 2007).
- Tumorske celice izražajo veliko dejavnikov angiogeneze, predvsem VEGF (angl. *Vascular Endothelial Growth Factor*). VEGF spodbuja tvorbo tumorskih krvnih žil (Pumiglia in Temple, 2006).
- Glioblastomske celice imajo visoko stopnjo izražanja genov za sintezo transporterjev ABC. Ti proteini so odgovorni za odpornost rakavih celic na terapijo s kemoterapevtiki (Dean in sod., 2005).
- Glioblastomske celice prekomerno izražajo kemokinski receptor CXCR4. Funkcija CXCR4 je usmerjanje migracije celic NSC med razvojem CŽS, zato naj bi bil odgovoren za visoko invazivnost glioblastomov (Ehtesham in sod., 2006).

2.2.4 Nevralne matične celice (NSC)

Pred desetletji je veljalo prepričanje, da možgani odraslih oseb ne vsebujejo matičnih celic in da se zato, v nasprotju z drugimi tkivi, ne morejo obnavljati. Danes ta tako imenovana »*no new neuron*« dogma ne drži več. Izkazalo se je, da nevrogeneza v možganih odraslih oseb zaradi prisotnosti tkivnih matičnih celic še vedno poteka (Weissman in sod., 2001).

Matične celice odraslih oseb se nahajajo v relativno dobro definiranem mikrookolju, v tako imenovanih nišah matičnih celic. Tam so celice do neke mere zaščitene pred stimulusi, ki bi lahko znatno vplivali na njihovo število - bodisi na zmanjšanje ali prekomerno proliferacijo (Moore in Lemischka, 2006). Tako v posebnih možganskih regijah najdemo tkivno specifične matične celice - nevralne matične celice (NSC). Njihove niše so predvsem v hipokampusu (*lat. Gyrus dentatus*) in v sprednjih lateralnih možganskih ventriklih (*subventrikularna cona*).



Slika 6: Prikaz niš nevralnih matičnih celic (NSC) v možganih odraslih ljudi. To sta predvsem *Gyrus dentatus* v hipokampusu in subventrikularna cona sprednjih lateralnih možganskih ventriklov (prirejeno po Vescovi in sod., 2006).

Za celice NSC je tako kot za vse matične celice značilno, da so nediferencirane celice z visokim proliferacijskim potencialom. Njihova glavna vloga je vzdrževanje tkivne homeostaze v možganih. Lahko se asimetrično delijo, pri čemer se nekatere potomke specifično diferencirajo (Vescovi in sod., 2006). Tako nastajajo nevroni, astrociti in oligodentrociti (Weissman in sod., 2001). Samoobnavljanje celic NSC regulirajo endotelijske celice, zato se celice NSC nahajajo v nišah tesno ob krvnih žilah (Palmer in sod., 2000).

2.2.5 Možganske tumorske matične celice (BTSC)

Vedno več je dokazov, da nastanek in rast tumorja vodijo tumorske matične celice (Reya in sod., 2001; Singh in sod., 2003, 2004a, 2004b; Galli in sod., 2004; Marx, 2003). Do danes so določene tumorske matične celice v raku na prsih (Al-Hajj in Clarke, 2004) in tumorjih CŽS (Singh in sod., 2004a, Galli in sod., 2004). Vse tumorske celice možganskih tumorjev nimajo enake sposobnosti iniciacije in razvoja tumorja. Le redka populacija tumorskih celic (med 0,01% in 5% vseh tumorskih celic) ima visok proliferacijski potencial (Al-Hajj in Clarke, 2004).

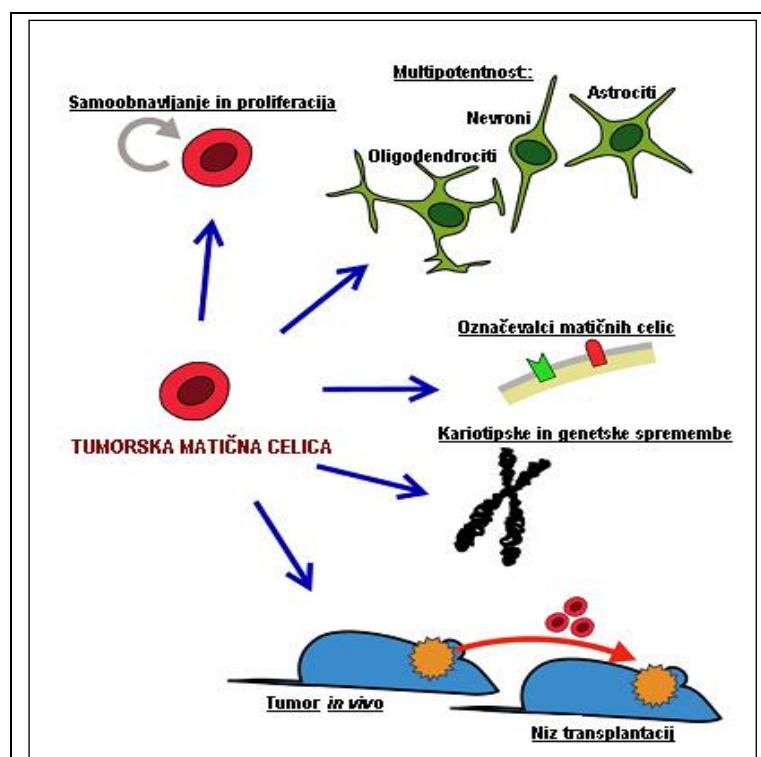
Ugotovitev, da je ta maloštevilna celična populacija na molekularnem in fenotipskem nivoju zelo podobna celicam NSC, je vodila v oblikovanje koncepta o obstoju možganskih tumorskih matičnih celic BTSC (*angl. Brain Tumour Stem Cells*) (Singh in sod., 2003). Podobnost z normalnimi celicami NSC nakazuje tudi, da število potrebnih mutacij za njihov nastanek ni veliko (Bjerkvig in sod., 2005).

Preglednica 3: Ključna odkritja na področju možganskih tumorskih matičnih celic (Stiles in Rowitch, 2008)

2. polovica 19. stoletja	Lobstein in Cohnheim opazita podobnost med embriogenezo in biologijo rakavih celic.
1926	Bailey in Cushing postavita sistem za razvrščanje možganskih tumorjev, na katerem temelji sodobna taksonomija. Razvrstitev poudarja histološko podobnost možganskih tumorskih celic s celicami razvijajočega se CŽS.
60. leta 20.stoletja	Metcalf in Saachs razvijeta <i>in vitro</i> klonogenske teste za prikaz krvnih progenitorskih celic.
1966	Altman in Das opišeta postnatalno nevrogenezo v podganah.
1988	Weissman s sodelavci izolira multipotentno hematopoetsko matično celico.
1992	Reynolds in Weiss identificirata postnatalne prednice nevralnih celic (kultura nevrosfer).
1994	Dick s sodelavci izolira maligne matične celice iz akutne mieloidne levkemije pri človeku.
2000	Uchida s sodelavci izolira človeške celice NSC.
2002-2004	Izolacija tumorskih matičnih celic iz astrocitomov (pri odraslih ljudeh in otrocih) (Galli in sod., 2004; Hemmati in sod., 2003; Singh in sod., 2003)

Celice BTSC izražajo naslednje celične označevalce: CD133, nestin, Musashi-1, Sox2 in MELK. Enake označevalce najdemo tudi pri celicah NSC odraslih ljudi (Hemmati in sod., 2003; Singh in sod., 2004a, 2004b; Galli in sod., 2004). Prav tako kot celice NSC, so tudi celice BTSC multipotentne in so sposobne samoobnove (Hemmati in sod., 2003).

Za celice BTSC so značilne številne kariotipske in genetske spremembe. Po *in vivo* transplantaciji lahko povzročijo razvoj tumorja (Singh in sod., 2003; Vescovi in sod., 2006). Kljub visokemu proliferacijskemu potencialu se celice BTSC v nišah redko delijo (Dell'Albani, 2008).



Slika 7: Lastnosti možganskih tumorskih matičnih celic (BTSC): samoobnavljanje in proliferacija *in vitro*, multipotentnost, izražanje označevalcev matičnih celic—npr. CD133 in nestina, kariotipske in genetske spremembe ter sposobnost induciranja nastanka tumorja pri miših po seriji transplantacij (Sutter in sod., 2007)

Preglednica 4: Lastnosti celic možganskega tumorja po katerih se te uvrščajo med tumorske matične celice (Vescovi in sod., 2006).

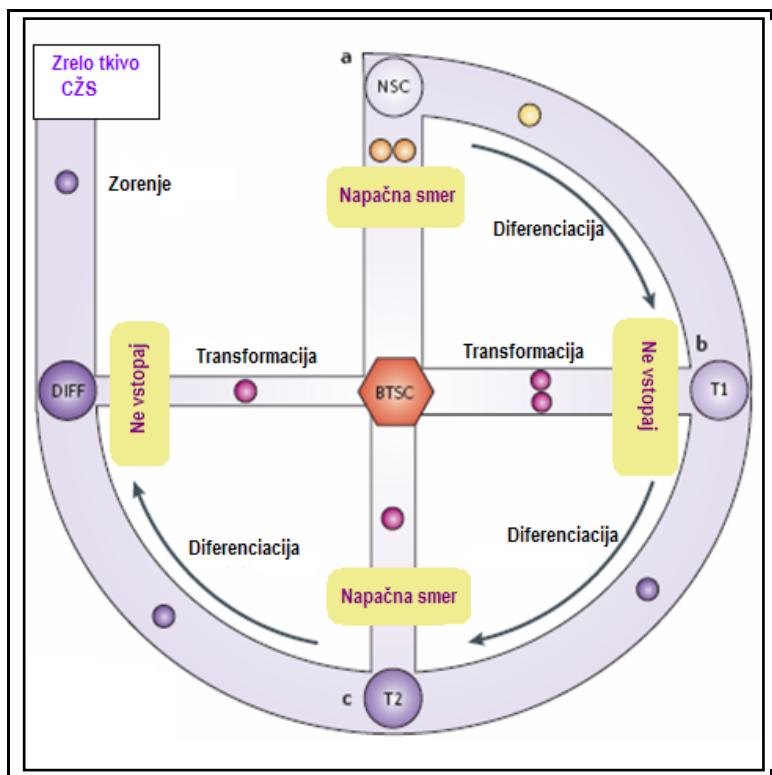
Lastnosti možganskih tumorskih matičnih celic

- Sposobnost iniciacije tumorjev po ortotopski implantaciji (tumor je fenokopija izvornega tumorja)
- Velika sposobnost samoobnove v *ex vivo* pogojih (zaporedne klonogenske in populacijsko-kinetične analize) in/ali v *in vivo* (serijske ortotopske transplantacije) pogojih.
- Spremenjeni geni in kariotip.
- Spremenjene diferenciacijske lastnosti (multipotentni diferenciacijski potencial).
- Sposobnost tvorjenja netumorigenih celic.

2.2.5.1 Izvor možganskih tumorskih matičnih celic (BTSC)

Mehanizem nastanka celic BTSC še vedno ni popolnoma razjasnjen. Sprva so domnevali, da celice BTSC nastanejo iz prekurzorskih oziroma iz že diferenciranih celic, ki so prestale številne mutacije. Po tej teoriji so celice BTSC odgovorne le za vzdrževanje že nastalega tumorja, ne pa za njegov nastanek in razvoj (Nicolis, 2007; Doetsch in sod., 2002).

Danes je najbolj uveljavljena razlaga, da so celice BTSC potomke celic NSC (slika 8). Celice NSC, ki so mitotsko sicer aktivne in v niši imajo dolgo življensko dobo so podvržene mutacijam. Kopiranje negativnih mutacij v celicah NSC vodi v nastanek celic BTSC. Do tega so pripeljale ugotovitve, da sta oba celična tipa, celice BTSC in celice NSC, izjemno podobna. Do neoplastičnih transformacij celic NSC in nastanka celic BTSC naj bi prišlo zaradi izgube nadzora nad celicami NSC v lastni tkivni niši (Wodarz in Gonzalez, 2006). Deregulacija obnovitvenih sposobnosti celic NSC in spremenjen diferenciacijski potencial usmerja rast in razvoj tumorja. Celice BTSC se lahko razvijejo tudi iz diferenciranih potomk celic NSC. Do tega prihaja zelo redko, ker je transformacijo zrelih potomk celic NSC težje doseči (Vescovi in sod., 2006).



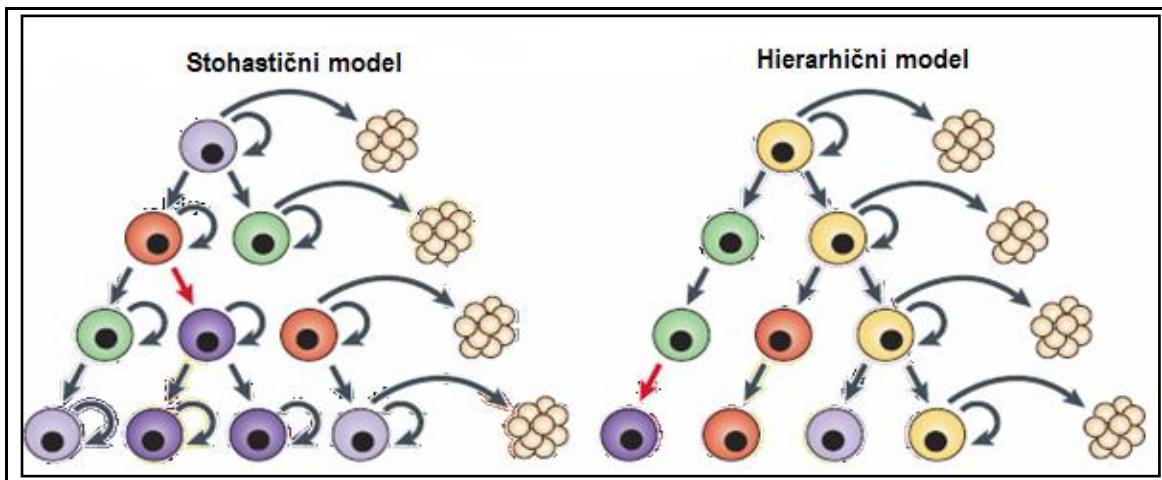
Slika 8: BTSC se lahko razvijejo direktno iz celic NSC ali iz bolj diferenciranih potomk celic NSC. T1 in T2 so deleče se prednike celice, prednice končno diferenciranih celic možganskega tkiva (DIFF). Na vsaki diferenciacijski stopnji je možen razvoj celic BTSC, vendar se z zorenjem celic verjetnost transformacije zmanjšuje (Vescovi in sod., 2006).

2.2.6 Iniciacija in razvoj možganskih tumorjev

Nastanek in proliferacijo rakavih celic opisujejo trije modeli: stohastični in hierarhični model ter model, po katerem rakave celice nastanejo po fuziji matičnih in mutiranih somatskih celic.

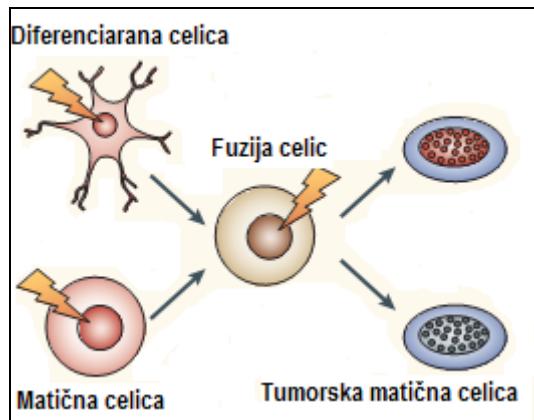
Klasični, *stohastični model* predvideva, da imajo vse rakave celice podoben tumorigeni potencial (slika 9). Tako je lahko vsaka izmed rakavih celic, ki se ne aktivirajo sočasno, začetnica tumorja (Nowell, 1976).

Nasprotje tej razlagi je *hierarhični model* (slika 9), ki danes uživa večjo podporo. Govori o obstoju redke tumorske celične populacije, ki jo odlikuje izjemno visok proliferacijski in tumorigeni potencial. To so celice BTSC. Ostale tumorske celice imajo znatno nižjo sposobnost proliferacije, zato se diferencirajo in v končni fazi usmerijo v celično smrt. Tako kot normalni organi, so tudi tumorji hierarhično organizirani – ločimo matične tumorske celice, prekurzorske celice in diferencirane celice (Reya in sod., 2001). Tumor je heterogena tvorba, sestavljen iz skupka celic na različnih diferenciacijskih stopnjah (Jackson in sod., 2006).



Slika 9: Prikaz stohastičnega in hierarhičnega modela proliferacije rakavih celic. Po klasičnem modelu imajo vse rakave celice znotraj tumorja enak tumorigeni potencial, kar pomeni, da je vsaka rakava celica potencialna začetnica tumorja. Hierarhični model govori o hierarhični organiziraniosti rakavih celic v tumorju, kjer le nekatere celice imajo visok tumorigeni potencial. To so možganske tumorske matične celice – celice BTSC (Vescovi in sod., 2006).

Alternativni model tumorigeneze predstavlja fuzija matičnih celic z mutiranimi somatskimi celicami (slika 10). Združene celice imajo lastnosti matičnih celic in veliko kromosomskih nepravilnosti, saj so zelo pogosto aneuploidne. Od normalnih matičnih celic fuzirane celice prevzamejo program za preživetje s katerim narekujejo rast in razvoj tumorja. Do transdiferenciacije normalne celice v rakavo lahko pride v zgodnjih, začetnih stopnjah tumorja ali kasneje, med rastjo in širjenjem tumorja (Bjerkvig in sod., 2005).



Slika 10: Fuzija celic kot možen mehanizem celične transdiferenciacije. Združitev somatske celice z matično celico lahko povzroči gensko nestabilnost, ki vodi v nastanek tumorske matične celice. Podobno, tumorska matična celica lahko nastane tudi po združitvi mutirane matične celice z normalno somatsko celico ali po združitvi normalne matične celice z mutirano somatsko celico. Mutacije so torej prisotne v matičnih, somatskih ali združenih celicah (Bjerkvig in sod., 2005).

Tumorske matične celice tako nastanejo iz tkivno specifičnih matičnih celic ali iz mezenhimskih matičnih celic in se lahko pojavijo po transdiferenciaciji somatskih celic ali po celični združitvi. Zato izraz »tumorske matične celice« označuje razne celice, ki jih

zdržuje sposobnost samoobnove in iniciacije tumorja. Prav zato bo potrebno v prihodnje natančneje opredeliti tumorske matične celice (Bjerkvig in sod., 2005).

2.2.7 Označevalci celic v možganskih tumorjih

Celični označevalci so receptorji, ki selektivno vežejo signalne molekule. Na površini vsake celice se nahaja kombinacija receptorjev, po kateri se celica loči od ostalih celičnih tipov. Slednje omogoča specifično identifikacijo celic. Za identifikacijo celic BTSC se predvsem uporablja označevalca CD133 in nestin. Vendar oba označevalca najdemo tudi na celicah NSC (Dell`Albani, 2008; Kania in sod., 2005).

2.2.7.1 CD133 (prominin-1)

CD133 ali prominin-1 je membranski glikoprotein iz petih transmembranskih domen. Odkrili so ga na mišjih nevropitelijskih matičnih celicah (Weigmann in sod., 1997). Človeški prominin-1 so prvič izolirali iz hematopoetskih matičnih celic. Pri tem so uporabili protitelo, ki specifično prepozna epitop proteina AC133. CD133 se nahaja na membranah različnih matičnih in tudi rakavih celic. Diferencirane celice ne izražajo CD133 (Kania in sod., 2005).

Kljud temu da je regulacija prepisovanja CD133 znana (pet promotorjev vodi prepis nekaj mRNA izoform prominina-1), njegova biološka funkcija še vedno ni pojasnjena. Zaradi izbočene lege na zunanjji membrani najbrž sodeluje pri migraciji celic in interakcijah matičnih celic z drugimi celicami ali z zunajceličnim matriksom. CD133 naj bi tudi določal celično polarnost (Dell` Albani, 2008).

CD133 pozitivne celice (CD133+) izolirane iz možganskih tumorjev imajo v *in vitro* pogojih lastnosti matičnih celic (Singh in sod., 2003). V *in vivo* pogojih so celice CD133+ zmožne iniciacije tumorjev. Prav zato naj bi tudi bile začetnice možganskih tumorjev oziroma možganske tumorske matične celice (BTSC) (Singh in sod., 2004a, 2004b).

Nekatere matične celice ne izražajo prominina-1, so celice CD133-, vendar pa so prav tako tumorigene (Beier in sod., 2007). Najbrž tudi v tem primeru kultura celic CD133- vsebuje nekaj celic CD133+, katerih delež se s precepljanjem celic poveča (Wu in sod., 2008; Wang in sod., 2008). Raven izražanja CD133 je znatno višji pri ponovno nastalih, neuspešno zdravljenih tumorjih kot pri primarnih tumorjih (Dell` Albani, 2008). Označevalec CD133 je tako prognostični kazalec - večji odstotek celic CD133+ v tumorskem tkivu napoveduje krajsi čas preživetja bolnika (Rebetz in sod., 2008).

2.2.7.2 Nestin

Nestin uvrščamo med proteine intermediarnih filamentov (IF) razreda VI. Po strukturi so IF zelo raznolika skupina citoplazemskih proteinov, kamor poleg nestina spadajo še vimentin, GFAP, nevrofilamenti itd. Intermediarni filamenti se v posameznih celičnih tipih

specifično izražajo. Najpomembnejšo funkcijo IF predstavlja njihov vpliv na morfoligijo celic, saj so gradbeni elementi citoskeleta. Sodelujejo tudi pri pritrjanju celic in pri celični proliferaciji (Dell' Albani, 2008).

Med razvojem sesalcev nestin nastaja v matičnih in progenitorskih celicah CŽS. Zato pravimo, da nestin sodi med označevalce hitro proliferirajočih in migrirajočih celic. Pri diferenciaciji celic se izražanje nestina zmanjša, v glia prekurzorjih pa se poveča izražanje drugih IF, zlasti GFAP. V odrasli dobi do ponovnega povečanega izražanja nestina pride ob določenih patoloških stanjih kot so možganske poškodbe, ishemije, vnetja in nastanek neoplazij. Nestin se nahaja tudi v jedru glioblastomskih celic, kjer sodeluje pri organizaciji kromatina in tako posredno regulira gensko izražanje (Dell' Albani, 2008).

2.2.8 Klinični pomen možganskih tumorskih matičnih celic (BTSC)

Teorija obstoja možganskih tumorskih matičnih celic (BTSC) je pomembna predvsem iz terapevtskega aspekta, saj so najbrž prav celice BTSC vzrok za neuspešno konvencionalno zdravljenje tumorjev. Uveljavljeni pristopi (radioterapija in kemoterapija) ciljajo na uničenje celotne tumorske gmote. S tem pa ni možno popolnoma odstraniti vseh tumorskih celic, zlasti celic BTSC. Celice BTSC naj bi bile namreč bolj odporne na kemoterapetike, ker izražajo gene za odpornost na zdravila (npr. BCRP1), gene za popravljanje DNA poškodb ob kemo- in radio-terapiji (npr. MGMT) in gene, ki zavirajo apoptozo (Liu in sod., 2006). Preživele celice BTSC zato obnovijo tumor, ki je bil izpostavljen agresivni kemo- in radioterapiji. V eksperimentalnih pogojih celo manj kot 100 celic BTSC zadostuje za razvoj možganskega tumorja (Wu in sod., 2008).

Cilj terapevtskih pristopov bi tako moral biti popolna odstranitev celic BTSC. Pri tem pa je najprej potrebna natančna opredelitev razlik med normalnimi (NSC) in neoplastičnimi celicami (BTSC), ki so si fenotipsko zelo podobne. Šele nato bo mogoče določiti primerne tarče visoko specifičnih zdravil. V nasprotnem primeru bi zdravila lahko delovala citotoksično tudi na celice NSC, ki pa so potrebne za normalno delovanje možganov (Fan in sod., 2006).

Novi, potencialni pristopi uničenja celic BTSC tako temeljijo na (Kroeger in sod., 2010):

- Zaviranju rasti celic, ki izločajo faktorje angiogeneze (predvsem VEGF, angl.«vascular endothelial growth factor»).
Celice BTSC z izločanjem faktorjev angiogeneze spodbudijo migracijo epitelijskih celic in oziljenje tumorja (Pumiglia in Temple, 2006; Bao in sod., 2006b). Celice BTSC so tesno povezane z epitelijskimi celicami, saj sočasna transplantacija celic BTSC in epitelijskih celic pospeši rast in razvoj tumorja (Calabrese in sod., 2007). Tudi glioblastomske celice so sestavni del žilnega prepleta tumorja (Shaifer in sod., 2010). Zaviranje angiogeneze (npr. z zdravilom bevacizumab) in zmanjševanje stabilnosti niše tumorskih celic sta tako potencialno učinkovita pristopa za zdravljenje glioblastomov.

- Tarčnem izničenju učinkov genov, ki zavirajo apoptozo celic BTSC in jim omogočajo rezistenco na kemoterapevtike (Ghods in sod., 2007).

Celice BTSC, ki imajo inhibirano signalno pot Notch (z γ -sekretazo ali Notch shRNA) ali znižan nivo izražanja SrT1 in HSP90 je lažje uničiti z radioterapijo (Wang in sod., 2009; Chang in sod., 2009; Sauvageot in sod., 2009).

Apoptzo celic BTSC povzroča tudi prekomerno izražanje miRNA-32. Mikro RNA so kratke, 19-25 nukleotidov dolge molekule RNA, ki regulirajo gensko izražanje z inhibicijo translacije ali z aktivacijo razgradnje tarčnih mRNA (Conti in sod., 2009).

- Zaviranju izražanja celičnih označevalcev celic BTSC.

Identificirani označevalci celic BTSC so: CD133, CD15, L1CAM in A2B5. Pomanjkljivost označevalcev CD133 in CD15 je, da se izražata tudi v normalnih nevralnih matičnih celicah. Označevalec L1CAM pa je receptor, ki se specifično izraža le v celicah BTSC. L1CAM regulira med- in znotrajcelične signalne poti pritrjevanja, migracije, preživetja, rasti in invazivnosti tumorskih celic. Zaviranje izražanja L1CAM s specifično shRNA *in vitro* torej zmanjša rast celic BTSC. A2B5 je označevalec glia progenitrskih celic v subventrikularni coni možganov odraslih in zato je povečan nivo njegovega izražanja smatran kot kazalec možganskih tumorjev (Bao in sod., 2008).

- Zaviranju specifičnih signalnih poti in aktivacije popravljalnih mehanizmov molekul DNA v celicah BTSC med radioterapijo (Zhou in sod., 2009; Bao in sod., 2006a). Glavne signalne poti, ki vzdržujejo rast in razvoj celic BTSC so:

- RTK-Akt in Notch signalna pot;
- Hedgehog-Gli-, Wnt- β -katenin -, STAT3 –, GSK3- β - singnaliziranje;
- S proteinom BMP in TGF- β regulirani celični procesi.

- Uničenju hipoksičnih niš celic BTSC (Heddleston in sod., 2009).

V tumorjih znižana koncentracija kisika spodbuja angiogenezo, migracijo rakavih celic in poveča njihovo odpornost na radioterapijo (Jensen in sod., 2009). Zato bi motnje v mikrookolju celic BTSC, zlasti v hipoksičnih nišah, lahko bile nov pristop zaviranja celic BTSC. Celični odgovor v hipoksičnih razmerah regulirajo faktorji HIF (angl. »*Hypoxia Inducible Factors*«). V celicah BTSC se ob spremembri hipoksičnega okolja pojavi specifični faktor HIF2 α (Li in sod., 2009).

- Sprožjanju diferenciacije celic BTSC.

Celice BTSC so tako kot celice NSC multipotentne in se lahko diferencirajo v astrocite, oligodendrocite in nevrone. Diferencirane celice BTSC v *in vitro* pogojih izgubijo sposobnost samoobnove in v *in vivo* pogojih niso tumorigene (Bao in sod., 2006b). Najpomembnejša regulatorja diferenciacije celic BTSC sta: BMP (angl. »*Bone Morphogenetic Protein*«) in PTEN (angl. »*Phosphatase and Tensin homolog*«). Indukcija izražanja BMP in PTEN bi lahko usmerila diferenciacijo rakavih celic, kar bi bilo uporabno za terapijo. Diferenciacijo celic BTSC sproža tudi prekomerno izražanje mikro RNA: miR-124, miR-137 in miR-451 (Kroeger in sod., 2010).

2.3 UPORABA CELIC MSC V TERAPEVTSKE NAMENE

Avtologne ali alogene, krvotvorne matične celice iz kostnega mozga (celice MSC) so zaradi izjemnih lastnosti (plastičnosti in visokega diferenciacijskega potenciala) vsestransko uporabne (Birnbaum in sod., 2007). Prednost uporabe celic MSC je tudi, da niso imunogene (Uccelli in sod., 2006). Bolezenska stanja, ki jih že zdravimo s celicami MSC so (Strbad in Rožman, 2005):

- Različna rakava obolenja (levkemije, limfomi, retinoblastomi)
- Bolezni kostnega mozga in anomalije hemoglobina (anemija srpastih celic, beta talesemija)
- Prirojene presnovne motnje (Lesch-Nyhanov sindrom)
- Imunske pomanjkljivosti (kronične granulomatoza)
- Osteopetroze, histocitoze Langerhansovih celic in druga dedna obolenja
- Zdravljenje posledic miokardnega infarkta

Ob poškodbah tkiv, kosti in pri angiogenezi se sproščajo kemokini, ki stimulirajo migracijo celic MSC na mesto poškodbe (Birnbaum in sod., 2007). V tarčnem tkivu se celice MSC koncentrirajo in delujejo le v prizadetih področjih. Podobno tudi tumorji izločajo dejavnike, ki spodbujajo migracijo celic MSC do rakave tvorbe (Nakamura in sod., 2004). Celice MSC so se sposobne prebiti v središče tumorske tvorbe in vgraditi v celično steno tumorskih krvih žil (Bexell in sod., 2009).

Celice MSC pod vplivom rakavih celic sintetizirajo in izločajo kemokine in encime (npr. CCL5 pri raku na prsih, asparagin sintetaza pri levkemiji), ki delujejo parakrino v prid rakavim celicam. Rakave celice postanejo bolj gibljive, poveča se jim invazivnost in sposobnost metastaziranja (Karnoub in sod., 2007). Tako na primer akutne limfoblastne celice pri levkemiji (celice ALL), ki ne morejo sintetizirati zadosti asparagin sintetaze, preživijo prav zaradi celic MSC. Te izločajo encim asparagin sintetazo v neposredno bližino rakavih celic in jim omogočajo preživetje. Zato je terapija, ki temelji na uporabi asparaginaze (inaktivacija asparagin sintetaze v celicah ALL) neučinkovita (Iwamoto in sod., 2007). Pri možganskih tumorjih glioblastomske celice izločajo različne citokine, ki spodbujajo angiogenezo (IL-8, TGF- β 1, NT-3, VEGF in Ang1) in narekujejo gibanje celic MSC. S povečevanjem žilnega prepleta tumorja pa celice MSC vplivajo na krepitev tumorja (Nakamura in sod., 2004; Birnbaum in sod., 2007).

Celice MSC služijo tudi kot orodje funkcionalne genomike, uporabljamо jih za analizo genov in testiranje zdravil, z njimi pa se srečamo tudi v regenerativnem tkivnem inženirstvu (Nakamura in sod., 2008). V regenerativni medicini pa se vedno bolj uporablja celice MSC s spremenjenim genskim zapisom. Pomanjkljivost celic MSC je, da po določenem številu delitev preidejo v senescenco, ki je s terapevtskega stališča izjemno neugodno stanje. Genetska manipulacija omogoča pripravo nesmrtnih linij celic MSC, ki pa iz varnostnega vidika niso primerne za uporabo v medicini. Tako transformirane celice MSC imajo namreč tumorigeni potencial (Rubio in sod., 2008).

2.3.1 Zdravljenje gliomov s pomočjo celic MSC

Modifikacije celic MSC, ki obsegajo vnos genov za citokine, odpirajo nove možnosti za zdravljenje doslej neozdravljivih možganskih tumorjev. Dokazano je, da med celicami MSC in rakavimi celicami poteka medcelična komunikacija, zato je izražanje citokinov v neposrednem stiku s tarčnimi (rakavimi) celicami in zdravljenje raka na ta način zelo obetaven pristop (Nakamizo in sod., 2005; Nakamura in sod., 2008; Bexell in sod., 2010).

Celična terapija zdravljenja gliomov temelji na interakcijah med celicami MSC in rakavimi celicami. Pri tem se uporabljam gensko spremenjene in navadne celice MSC. Gensko spremenjene celice MSC iz kostnega mozga bi se lahko uporabljale za (Kang in sod., 2005):

- a) *dostavni sistem (angl. »delivery vehicle«) za zdravila oziroma gene (angl. »gene delivery«):*

V celice MSC bi vstavili gene za dejavnike, ki povzročajo apoptozo rakavih celic (FasL, perforin) ali gene, ki spodbujajo imunski odgovor (γ -INF, IL-4). Rakave celice privabljajo celice MSC v svojo neposredno bližino, zato bi bila aktivirana celična smrt omejena le na rakavo tkivo.

- b) *celično imunoterapijo:*

Celice MSC, ki jih aktiviramo s citokini (IL-2, IL-15, GM-CFS), fenotipsko postanejo imunske efektorske celice s citotoksičnim delovanjem na rakave celice. Na površini celic se lahko pojavita označevalca CD8 (značilen za citotoksične T celice) in CD161a (značilen za naravne ubijalke - celice NK (angl. »Natural Killer cells«)).

Pomanjkljivost uporabe gensko spremenjenih celic MSC iz kostnega mozga za zdravljenje raka je pogosto upadanje izražanja vstavljenega gena. Dodatno oviro predstavlja imunsko posredovano odstranjevanje celic MSC, ki gensko spremenjene celice prepozna kot virusno okužbo (vključek v teh celicah je ponavadi adenovirusnega izvora) (Nakamura in sod., 2004).

Mnenja glede vpliva gensko nespremenjenih celic MSC na potek zdravljenja tumorjev so deljena. Nekatere raziskave poročajo o neugodnem vplivu celic MSC v antitumorski terapiji (Nakamura in sod., 2004; Karnoub in sod., 2007; Birnbaum in sod., 2007), obstajajo pa tudi raziskave, ki govorijo o pozitivnem, antitumorskem delovanju celic MSC (Maestroni in sod., 1999; Hombauer in Minguell, 2000).

Celice MSC naj bi zavirale rast in metastaziranje primarnih možganskih tumorjev z izločanjem hematopoetskih citokinov in z značilno razporeditvijo ob robu tumorja. Na ta način tvorijo fizično bariero, ki preprečuje nadaljnje razširjanje glioma v normalni možganski parenhim. Specifičnost glioblastomov je namreč, da so močno disperzni in zato operativno zelo težko odstranljivi tumorji (Nakamura in sod., 2004).

Alternativna oblika uporabe celic MSC iz kostnega mozga za zdravljenje gliomov je njihova diferenciacija v nevralne progenitorske celice, ki prav tako zavirajo rast intrakranialnih tumorjev (Honeth in sod., 2006). Tudi gensko spremenjene nevralne

matične celice (celice NSC) učinkovito sprožajo apoptozo tumorskih celic. Celice NSC, ki nosijo genski zapis za protein TRAIL (sproža apoptozo) sledijo tumorskim celicam in tako povzročajo apoptozo tumorskih celic, ki so precej oddaljene od primarne tumorske gmote (tumorski sateliti) (Ehtesham in sod., 2002). Protein TRAIL pri selektivnem sprožanju apoptoze gliomskih celic nima citotoksičnih učinkov na celice NSC. Odpornost celic NSC na protein TRAIL zagotavlja proteina cFLIP in PED/PEA-15, ki onemogočata cepitev citoplazemske kaspaze 8, ki vodi v apoptizo. Proteina cFLIP in PED/PEA-15 sta odsotna v neoplastičnih celicah, zato apoptiza z TRAIL ni ovirana (Xiao in sod., 2002).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 CILJI RAZISKAVE

Številne raziskave *in vitro* in *in vivo* modelov kažejo, da so celice MSC iz kostnega mozga potencialno učinkovito orodje pri ciljani terapiji mnogih neozdravljenih rakavih obolenj, med drugim tudi glioblastomov. Preden bi celice MSC dejansko bile varne za uporabo v terapevtske namene je potrebna natančna opredelitev njihovih lastnosti in interakcij s GBM tumorji.

Osnovni namen mojega diplomskega dela je bil ovrednotiti **lastnosti celic MSC** izoliranih iz kostnega mozga in proučiti njihov vpliv **na izolacijo celic CD133+ iz primarne kulture glioblastoma**.

Naša raziskava je potekala v naslednjih korakih:

- Najprej smo ovrednotili rastne in morfološke lastnosti celic MSC izoliranih iz dveh donorjev.
- Zanimala nas je dinamika rasti - hitrost podvajanja in staranja obeh populacij celic MSC. Dejstvo je, da v celicah MSC po določenem številu delitev nastopi replikativna senescenca.
- Dalje smo analizirali diferenciacijski potencial obeh linij celic MSC. Preverili smo uspešnost indukcije diferenciacije celic MSC v maščobne, hrustančne in kostne celice in s tem dokazali multipotentni potencial celic MSC.
- Nazadnje smo preverili tudi vpliv celic MSC na rast tumorskih matičnih celic CD133+ v primarni kulti celic GBM. Upoštevajoč podatke iz literature so celice CD133+ možganske tumorske matične celice (BTSC) ozziroma tiste celice, ki so odgovorne za rezistenco glioblastomov na trenutno dostopne metode zdravljenja. Z izpostavitvijo celic GBM kondicioniranem mediju celic MSC smo preverili vpliv dejavnikov celic MSC na proliferacijo celic CD133+ izoliranih iz primarne kulture GBM.

3.2 DELOVNA HIPOTEZA

Naše delovne hipoteze so bile naslednje:

- a. Proliferacijski potencial celic MSC se po daljšem *in vitro* gojenju zmanjšuje – celice nižjih pasaž se delijo hitreje kot celice poznejših pasaž, pri katerih na določeni stopnji nastopi senescenca.
- b. Celice MSC so multipotentne celice – zato je možna indukcija diferenciacije celic MSC v maščobne, hrustančne in kostne celice. Predvidevamo, da starost celic MSC oz. uporabljena pasaž vpliva na preferenčno pot diferenciacije.
- c. Obe celični liniji celic MSC, ki izvirata iz različnih donorjev, imata podobne proliferacijske in diferencicijske lastnosti (naštete pod a in b).
- d. Celice MSC zavirajo rast in proliferacijo celic CD133+ v primarni kulturi celic GBM.

3.3 MATERIALI

3.3.1 Kemikalije in laboratorijska oprema

3.3.1.1 Kemikalije

Preglednica 5: Seznam uporabljenih kemikalij.

Kemikalija	Proizvajalec
DMEM, 1x	Sigma-Aldrich, ZDA
FBS	Biochrom AG, Nemčija
PBS, 10x	PAA Laboratories, Avstrija
L-glutamin, 200 mM	PAA Laboratories, Avstrija
Penicilin/streptomycin	Euro Clone, Italija
Na-piruvat, 100 mM	Gibco Invitrogen, ZDA
Tripsin-EDTA, 0,25 %, 1x	Gibco Invitrogen, ZDA
Tripan modro, 0,4 %	Sigma-Aldrich, ZDA
DMSO	Sigma-Aldrich, ZDA
BSA	Sigma-Aldrich, ZDA
Metanol	Fluka, ZDA
Destilirana voda	NIB
Formaldehid	Sigma-Aldrich, ZDA
Glutaraldehid	Sigma-Aldrich, ZDA
X-Gal, 40 mg/mL	Sigma-Aldrich, ZDA
TGF β 3	R&D Systems, ZDA
L-askorbinska kislina	Sigma-Aldrich, ZDA
Kit za izolacijo celic CD133 <ul style="list-style-type: none"> • Protitelesa za označevanje celic CD133 (mišji IgG1) • FcR reagent za blokiranje nespecifične vezave 	Miltenyi Biotec, Nemčija
Indometacin	Sigma-Aldrich, ZDA
Inzulin	Sigma-Aldrich, ZDA
Deksametazon	Sigma-Aldrich, ZDA
Glicerofosfat	Sigma-Aldrich, ZDA
Alician Blue	Merck KgaA, Nemčija
Oil Red O	Sigma-Aldrich, ZDA
srebrov nitrat, 2%	Merck KgaA, Nemčija
Mayerjeva raztopina hematoksilina	Sigma-Aldrich

3.3.1.2 Laboratorijska oprema

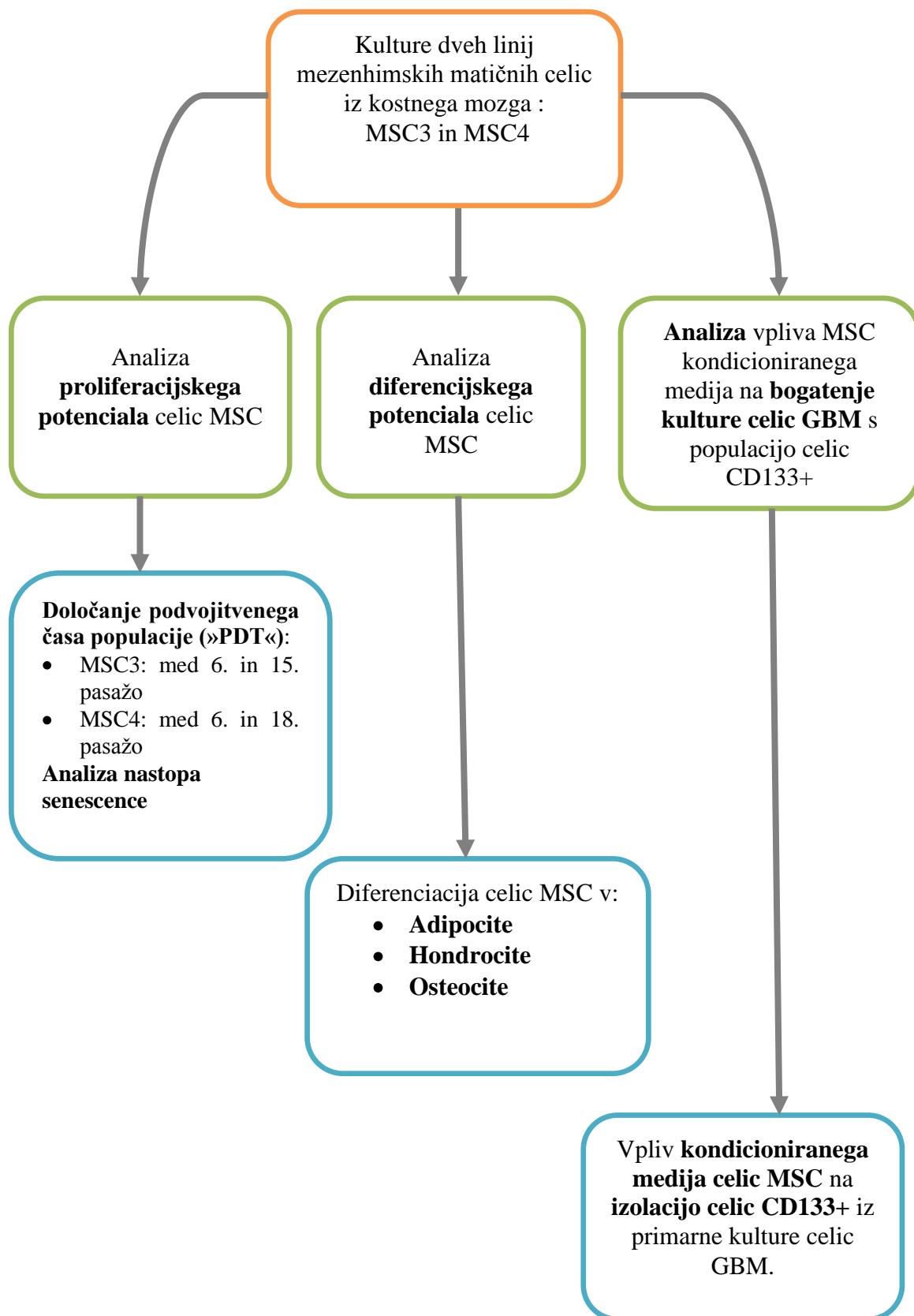
Preglednica 6: Seznam uporabljene laboratorijske opreme.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Brezprašna celična komora	Iskra Pio, Slovenija
Centrifuga	Tehnica Železniki, Slovenija
Centrifugirke (15 mL)	Corning , ZDA
Centrifugirke (50 mL)	Corning , ZDA
Digestorij	Koetterman, Nemčija
Inkubator s 5 % CO ₂ , 37 °C	Sanyo Electric, Japonska
Epruvete za zamrzovanje celic (2 mL)	Costar, ZDA
Nastavki za pipete	Costar, ZDA
Plastenke za kulture s perforiranim zamaškom (75 in 25 mL)	Corning, ZDA
Plošče za gojenje celic (s 4 in 6 vdolbinami) Becton Dickinson 35	Falcon BD, Francija
Objektna stekla	Hecht-Assistent, Nemčija
Krovna stekla za gojenje celic (premer 12 mm)	Hecht-Assistent, Nemčija
Pipete (2, 10, 20, 200, 1000 µL)	Biohit, Finska
Hemocitometer	Brand, Nemčija
Hladilnik	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalna skrinja (-20 °C)	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalna skrinja (-80 °C)	Angelantoni scientifica, Italija
Epruvete (1 mL)	Costar, ZDA
Epruvete za zamrzovanje	Corning , ZDA
Digitalni fotoaparat	Nikon, Japonska
Svetlobni mikroskop	Reichert, ZDA
Krovna stekla	Brand Lab, Nemčija
Stresalnik	IKA, Nemčija

3.4 POTEK DELA

Pri diplomski nalogi smo poskuse razdelili v tri sklope, ki iz različnih perspektiv obravnavajo primernost uporabe celic MSC v terapevtske namene (Slika 11). Vse poskuse smo zasnovali tako, da smo dobljene rezultate lahko primerjali med dvema linijama celic MSC, ki izvirata iz kostnega mozga različnih donorjev.

1. V prvem delu smo analizirali proliferacijske lastnosti dveh linij celic MSC. Ta del je neprekinjeno potekal več mesecev, saj nas je zanimalo, če/kdaj bo v celičnih kulturah nastopila senescenca.
2. Drugi del je vključeval poskuse diferenciacije – razvoj celic MSC do maščobnih, hrustančnih in kostnih celic.
3. V zadnjem delu pa smo se osredotočili na specifičen vpliv celic MSC na rakave celice oziroma na uspešnost izolacije tumorigenih prekurzorjev rakavih tvorb – celic CD133+ iz primarne kulture glioblastomskih celic. Označevalec CD133+ je značilen za najbolj tumorigeno celično populacijo. Analizirali smo učinek dejavnikov celic MSC, ki jih te izločajo v medij na rast celic CD133+ v primarni kulturi GBM.



Slika 11: Shematski prikaz poteka dela.

3.5 METODE

3.5.1 Priprava gojišča za celice MSC in celice GBM

Delo z vsemi celičnimi kulturami je potekalo v brezprašni komori v aseptičnih pogojih. Vse celice smo gojili v plastenkah s perforiranim pokrovčkom v CO₂ inkubatorju, pri temperaturi 37°C in atmosferi s 5% CO₂. Za gojenje celic MSC je velikost plastenk bila 25 cm² (T25), za gojenje celic GBM in občasno tudi celic MSC pa 75 cm² (T75).

Pri poskusih smo uporabljali dve liniji celic MSC iz kostnega mozga, MSC3 in MSC4 (Lonza, Inc.). Lastnosti teh celic so podane v preglednici 7. Celice MSC rastejo v monosloju pritrjene na podlago in so podolgovate, vretenaste oblike in zato po videzu podobne fibroblastom.

Pri gojenju in precepljanju celic MSC smo upoštevali priporočila prodajalca Lonza. Za gojenje celic MSC smo uporabljali MSC gojišče (preglednica 8). Za gojenje celic GBM smo uporabljali GBM gojišče (preglednica 9).

Preglednica 7: Lastnosti uporabljenih celic MSC.

Celice BM-MSC (angl. » <i>Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells</i> «)			
Oznaka	Kataloška številka	Donor	Opravljeni testi
MSC 3	Lonza 7F3677	temnopulta ženska, 22 let	<ul style="list-style-type: none"> testirani na viruse (HIV, HBV, HCV), mikoplazme, bakterije, kvasovke, glive 90% pozitivni na površinske antogene: CD105, CD166, CD29, CD44 negativni na hematopoetske markerje CD14, CD34, CD45
MSC 4	Lonza 6F4085	temnopolti moški, 33 let	<ul style="list-style-type: none"> testirani na viruse (HIV, HBV, HCV), mikoplazme, bakterije, kvasovke, glive 90% pozitivni na površinske antogene: CD105, CD166, CD29, CD44 negativni na hematopoetske markerje CD14, CD34, CD45

Preglednica 8: Sestava medija za gojenje celic MSC.

BM-MSC medij
<ul style="list-style-type: none"> • DMEM (1000 mg/L) • FBS serum – toplotno obdelan (10%) • Glutamin (2mM) • Penicilin/Streptomicin (1x)

Preglednica 9 : Sestava medija za gojenje celic GBM.

DF medij
<ul style="list-style-type: none"> • DMEM/F12 osnovni medij • FBS serum – toplotno obdelan (10%) • Glutamin (2mM) • Penicilin/Streptomicin (1x)

Med pripravo gojišč smo serum FBS vedno filtrirali z namenom odstranitve precipitata, ki je toksičen za celice. Gojišča in ostale raztopine smo hranili v hladilniku pri 4°C. Pred uporabo smo gojišča ogreli v vodni kopeli na 37°C.

3.5.2 Gojenje in precepljanje celic

Vse celične linije (MSC in GBM) rastejo v monosloju, pritjene na podlago. Gojišča smo celicam redno menjavali, vsake 2-3 dni. Ko so celice dosegle 70-80% konfluenco, smo jih precepili v novo plastenko, upoštevajoč Lonzina priporočila.

Z gojenjem celic MSC smo pričeli pri pasaži 6 z začetno gostoto nacepljanja 6000 celic/cm² (150 000 celic/T25 plastenko). Pri poskusih s celicami GBM smo uporabili celice GBM pasaže 4 ali 5. Začetna gostota nacepljanja celic GBM je bila 7000 – 8000 celic/cm².

Precepljanje celic je potekalo v naslednjih korakih:

- Najprej smo odstranili staro, izrabljeno gojišče in celice sprali z 1xPBS.
- Celicam smo dodali 1 mL proteolitičnega encima tripsina in ga pustili delovati 2 minuti. Delovanje encima smo spremljali pod svetlobnim mikroskopom.
- Nato smo dodali ustrezno gojišče in celično suspenzijo dobro premešali.
- Celično suspenzijo smo centrifugirali pri 1000 vrt/min 5 minut in odstranili supernatant.
- Celični pelet smo razbili z dodatkom ustrezne količine gojišča.
- Število celic smo določili s hemocitometrom. Ustrezno število celic smo prenesli v svežo plastenko.
- Preostale celice smo zavrgli.

3.5.3 Metoda štetja celic na hemocitometru

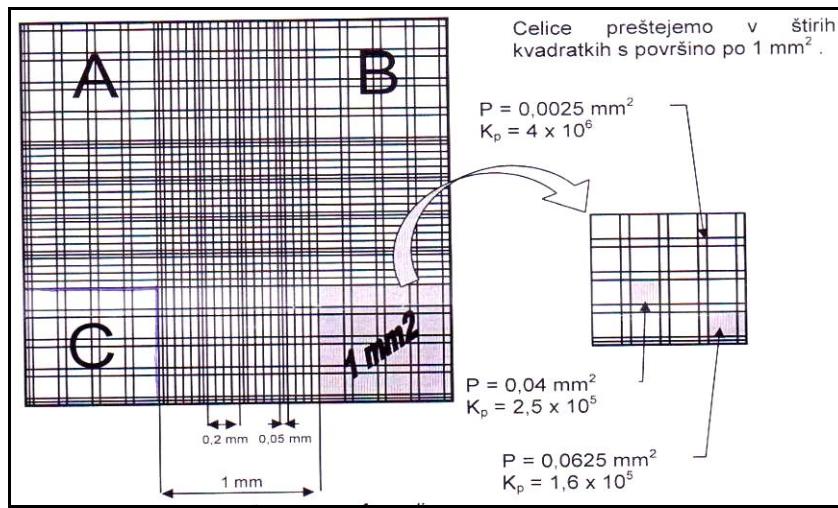
Pri štetju celic pod svetlobnim mikroskopom smo uporabili metodo barvanja s tripanskim modrilo, barvilom, ki specifično obarva celice s poškodovano membrano. To so mrtve celice, ki jih nismo šteli. Žive celice so ostale brezbarvne, pravilne okrogle oblike in so se pod mikroskopom svetile. Intaktnost njihove membrane namreč onemogoča vstop barvila v celično citoplazmo (Sever, 2007).

Postopek barvanja in štetja celic s hemocitometrom je bil sledeč:

- Po centrifugirjanju celic (1000 vrt/min, 5 minut), odstranitvi supernatanta in resuspendirjanju celic v svežem gojišču, smo iz dobljene suspenzije odpipetirali 10 µL.
- Tej celični suspenziji smo dodali 40 µL barvila tripansko modrilo.
- Mešanico celične suspenzije in barvila (skupaj 50 µL) smo nanesli na hemocitometer in prešteli viabilne celice v vseh štirih kvadratih hemocitometra.
- Število vseh celic v suspenziji smo izračunali po enačbi:

Preglednica 10: Enačba za izračun števila celic pri štetju s hemocitomerom (Sever, 2007).

$N=((A+B+C+D)/4) \times R \times K_p \times V_s$
<ul style="list-style-type: none"> ○ N: število vseh živih celic v suspenziji, kateri smo določali koncentracijo. ○ A, B, C, D: število celic v štirih kvadratih hemocitometra. ○ R: faktor redčenja. ○ K_p= 10^4. Prostornina suspenzije pod stekelcem je 0,1 µL (globina komore je 0,1mm). zato za izračun števila celic v 1mL, dobljeno vrednost pomnožimo z 10^4. ○ V_s: če smo imeli celice resuspendirane v drugačnem volumnu (ne v 1 mL), smo dobljeno vrednost pomnožili še z volumnom suspenzije.



Slika 12: Hemocitometer (Sever, 2007).

3.5.4 Spremljanje morfoloških sprememb celic MSC z uporabo svetlobnega mikroskopa

Gojene celice smo dnevno opazovali pod svetlobnim mikroskopom in jih sproti fotografirali. V celični kulturi smo spremljali razporeditev celic, njihovo obliko, velikost in količino plavajočih odmrlih celic ter celičnega drobirja.

3.5.5 Ocena proliferacijskega potenciala celic MSC z določanjem podvojitvenega časa populacije (angl.«PDT»)

Z izračunom populacijskega podvojitvenega časa smo želeli določiti dinamiko rasti celic MSC pri različnih pasažah. Zanimalo nas je, kako se staranje celične kulture oz. prehod v senescentno stanje odraža na hitrost celičnih delitev. Opazovanja smo primerjali med dvema linijama celic MSC (MSC3 in MSC4).

Oceno populacijskega podvojitvenega časa smo določali po naslednji enačbi:

$$PDT = \frac{24 \times \text{stevilo dni v kulturi}}{(\text{Log}(\text{št. požetih celic}) - \text{Log}(\text{št. nasajenih celic})) \times 3,32}$$

3.5.6 Analiza nastopa senescence v kulturah celic MSC pri dolgotrajnem *in vitro* gojenju

Stopnjo senescence smo preverili s pomočjo barvanja, ki odkrije aktiven encim β -galaktozidazo. Ta encim izražajo vse celice in je v optimalnih pogojih aktiven pri pH 4. Pri senescentnih celicah pa je izražanje β -galaktozidaze povečano in ta je aktivna pri nekoliko višjih pH vrednostih, pri pH=6. Določamo jo s citokemijskim barvanjem, kjer se uporabi kromogeni substrat X-gal (Gatza in sod., 2005).

Za naš poskus smo uporabili celice MSC linij MSC3 in MSC4 pri treh pasažah - pasaži 13, 18 in 25. Izbrana metoda dela je bila barvanje celic s kromogenim substratom, ki po delovanju β -galaktozidaze modro obarva le senescentne celice. Ostale, vitalne celice se v stiku z barvilom zaradi manjše količine endogene β -galaktozidaze ne obarvajo.

3.5.6.1 Metoda barvanja senescentnih celic z X-Gal

Celice MSC, katerim smo določili stopnjo senescence, smo gojili na plošči s štirimi jamicami (Becton Dickinson). Vsak poskus je potekal v vsaj dveh paralelkah in v dveh ponovitvah. Pred poskusom smo gojili celice do 50 % konfluence.

Barvanje z raztopino X-gal je potekalo v naslednjih korakih:

- S celic smo odstranili gojišče in jih 5 minut spirali v PBS.
- Odstranili smo pufer PBS. Sledila je 5 minutna fiksacija celic pri sobni temperaturi s predhodno pripravljeno raztopino fiksativa (0,2% glutaraldehid, 2% formaldehid).

- Odpipetirali smo fiksativ in celice 3x sprali s PBS.
- Sledilo je barvanje z raztopino, ki je vsebovala X-Gal substrat. V izogib izhlapevanja smo plošče ovili s para-filmom.
- Zaradi tveganja spremembe pH vrednosti in lažno pozitivnega rezultata je barvanje namesto v celičnem inkubatorju (5% CO₂) potekalo približno 20 ur v bakterijskem inkubatorju (normalna atmosfera, T=37°C). V celičnem inkubatorju povečana koncentracija CO₂ lahko povzroči kislost raztopine (zniža pH).
- Obarvanje celic smo analizirali pod svetlobnim mikroskopom.

3.5.7 Analiza diferenciacijskega potenciala celic MSC

Glede na to, da sta uporabljeni celični liniji celic MSC iz kostnega mozga kupljeni pri proizvajalcu (Lonza, Inc.), ki zagotavlja prisotnost označevalcev multipotentnosti, je sposobnost celic za diferenciacijo v adipocite, hondrocite in osteocite začetnih pasaž že potrjena. Nas pa je zanimalo, če celice BM-MSC multipotentnost ohranijo tudi pri nekoliko višjih pasažah in ali je njihova diferenciacija v posamezne celične tipe enako učinkovita oz. ali se celice pri višjih pasažah preferenčno diferencirajo le v določene celične tipe. To bi pomenilo, da njihov multipotentni potencial upada.

Za diferenciacijske poskuse smo uporabili dve liniji celic MSC iz kostnega mozga - MSC3 pri pasaži 7 (MSC3 p7) in celice MSC4 pri pasaži 8 (MSC4 p8). Vsi diferenciacijski poskusi so potekali v gojilnih posodicah s šestimi jamicami in sicer za vsako celično linijo v dveh paralelkah. Pred začetkom diferenciacijskega poskusa smo celice nacepili pri gostoti 5000 celic/cm². Do doseganja konfluence smo za gojenje uporabljali DMEM-Lg (angl. »*Low Glucose*«) medij z 10% FBS, 2mM glutaminom in 1x Penicilin/Streptomicinom. Medij smo celicam menjavali vsaka 2-3 dni.

3.5.8 Adipogeneza

Ko so gojene kulture celic MSC dosegle približno 90% konfluenco, smo jih naslednje 3 dni gojili v induksijskem mediju za adipogenezo IM (angl. »*Induction Medium*«), ki vsebuje 100 µM indometacina. Po tem smo celice 24 ur izpostavili vzdrževalnemu mediju MM (angl. »*Maintainance Medium*«). Zaporedje 3-dnevnega tretmaja z IM in 24urnega tretmaja celic z MM smo ponovili še dvakrat. Na koncu smo celice še teden dni gojili v MM mediju, ki smo ga menjavali vsaka 2-3 dni. Negativno kontrolo so predstavljale celice, gojene le v MM mediju. Uspešnost adipogeneze smo potrdili z detekcijo znotrajceličnih maščobnih vakuol. Morfološke spremembe celic smo opazovali z mikroskopom pred, med in po sami diferenciaciji ter jih fotografirali.

Preglednica 11: Sestava induksijskega in vzdrževalnega medija pri diferenciaciji celic MSC v adipocite.

Indukcijski medij (IM): 3 dni
<ul style="list-style-type: none"> • DMEM-lg (Sigma-Aldrich, ZDA) • 10% FBS (Biochrom AG, Nemčija) • 2 mM Gln (PAA, Avstrija) • Penicilin/Streptomicin (Euroclone, Italija) • 10 µg/mL inzulin (Sigma-Aldrich, ZDA) • 100 µM indometacin (Sigma-Aldrich, ZDA)
Vzdrževalni medij (MM): 1 dan
<ul style="list-style-type: none"> • DMEM-lg (Sigma-Aldrich, ZDA) • 10% FBS (Biochrom AG, Nemčija) • 2 mM Gln (PAA, Nemčija) • Penicilin/Streptomicin (Euroclone, Italija) • 10 µg/mL inzulin (Sigma-Aldrich, ZDA)

3.5.8.1 Detekcija znotrajceličnih maščobnih vakuol z metodo »*Oil Red O Staining*«

Postopek detekcije znotrajceličnih maščobnih vakuol adipocitov vključuje fiksacijo pritrjene celične kulture, pripravo barvila *Oil Red O* in barvanje celic.

Najprej smo pripravili 5% založno raztopino *Oil Red O* barvila v 99% izopropanolu in Mayerjevo raztopino hematoksilina (49% vodna raztopina KAl(SO₄)₂ in 0,1% hematoksilina). Sledila je fiksacija adipogene celične kulture celic MSC, ki smo jo opravili v digestoriju. Pri tem smo celicam najprej odstranili medij, sprali s pufrom PBS in 10 minut fiksirali s 4% paraformaldehidom. Po fiksaciji smo celice sprali s sterilno vodo in barvali 30 minut z 0,18% raztopino *Oil Red O* barvila. Nato smo celice ponovno sprali z destilirano vodo in barvali s filtrirano Mayer-jevo raztopino hematoksilina (10 minut). Na koncu smo celice sprali z destilirano vodo in jih fotografiirali.

3.5.9 Hondrogenese

Ko so gojene kulture celic MSC dosegle približno 90% konfluenco, smo pričeli z 21-dnevno indukcijo hondrogenoze. Pri tem smo uporabili medij, ki vsebuje rekombinantni človeški TGFβ3 (R&D Systems, Inc.) in L-askorbinsko kislino (Sigma-Aldrich, ZDA). TGFβ3 (angl. »*Transforming Growth Factor Beta 3*«) je pleiotropni citokin, ki regulira številne celične procese: imunsko delovanje, proliferacijo itd. Celicam smo medij menjavali vsaka 2-3 dni. Za negativno kontrolo so nam služile celice gojene v DMEM-lg mediju z 10% FBS, 2mM glutaminom in 1x Penicilin/Streptomicin. Tudi kontrolnim celicam smo medij menjavali vsaka 2-3 dni. Spremembe celic smo opazovali z mikroskopom pred, med in po sami diferenciaciji ter jih fotografiirali.

Preglednica 12: Sestava medija za indukcijo diferenciacije celic MSC v hondrocyte.

Medij za indukcijo hondrogenoze: 21 dni
<ul style="list-style-type: none"> • DMEM-lg (Sigma-Aldrich, ZDA) • 10% FBS (Biochrom AG, Nemčija) • 10 ng/ml TGFβ3 (R&D Systems, ZDA) • 50 μg/ml L-askorbinska kislina (Sigma-Aldrich, ZDA)

3.5.9.1 Detekcija mukopolisaharidov in glikozaminoglikanov

Uspešnost hondrogenoze smo dokazovali z barvanjem z *Alician Blue*. S tem barvilom določamo mukopolisaharide in glikozaminoglikane, ki so sestavni del zunajceličnega matriksa hrustančnega tkiva. *Alician Blue* pobarva sulfirane in karboksilirane kisle mukopolisaharide in sialomucine (glikoproteini) in sodi v skupino polivalentnih vodotopnih osnovnih barvil.

Celicam smo najprej odstranili medij, jih sprali s pufrom PBS in jih 10 minut fiksirali v 4% paraformaldehidu. Nato smo odstranili fiksativ in celice ponovno sprali s PBS. Temu je sledilo 30-minutno barvanje z barvilm *Alician Blue* (1% *Alician Blue* v 3% raztopini ocetne kisline, pH=2,5). Celice smo na koncu sprali z destilirano vodo in jih fotografirali.

3.5.10 Osteogeneza

Ko so gojene kulture MSC celic presegle 70% konfluenco, smo pričeli z 21-dnevno indukcijo osteogene diferenciacije. Uporabili smo medij, ki vsebuje deksametazon, askorbinsko kislino in glicerofosfat. Za negativno kontrolo smo uporabili celice gojene v mediju DMEM-lg z 10% FBS, 2 mM glutaminom in 1x Penicilin/Streptomicin. Testnim in kontrolnim kulturam smo medij menjavali vsaka 2-3 dni. Spremembe celic smo opazovali z mikroskopom pred, med in po sami diferenciaciji ter jih fotografirali.

Preglednica 13: Sestava medija za indukcijo diferenciacije celic MSC v osteoblaste.

Medij za indukcijo osteogeneze: 21 dni
<ul style="list-style-type: none"> • DMEM-lg (Sigma- Aldrich, ZDA) • 10% FBS (Biochrom AG,Nemčija) • 0,1 μM deksametazon (Sigma- Aldrich, ZDA) • 50 μg/ml L-askorbinska kislina (Sigma- Aldrich, ZDA) • 10 mM glicerofosfat (Sigma- Aldrich, ZDA)

3.5.10.1 Detekcija kalcijevih depositov: barvanje po Von Kossa

Uspešno diferenciacijo celic MSC v osteoblaste smo dokazali z barvanjem po Von Kossa, ki detektira kalcijeve depozite, tipične elemente kostnega tkiva.

Celicam smo najprej odstranili medij, jih sprali s pufrom PBS in jih 15 minut fiksirali v 4% paraformaldehidu. Po fiksaciji smo celice sprali z destilirano vodo. Temu je sledilo 15-minutno barvanje z 2% srebrovim nitratom, ki smo ga izvedli v temi. Na koncu smo celice

ponovno sprali z destilirano vodo in jih za 15 minut izpostavili svetlobi. Sledilo je fotografiranje celic.

3.5.11 Vpliv MSC kondicioniranega medija na bogatenje primarne kulture celic GBM s populacijo celic CD133+

Pri tem poskusu smo proučevali vpliv MSC kondicioniranega medija na gojenje primarnih kultur celic GBM. Zanimalo nas je, če MSC kondicionirani medij lahko spremeni delež celic CD133+ v primarni kulturi celic GBM.

3.5.11.1 Gojenje celic GBM

Celice GBM smo gojili v plastenkah velikosti 75cm^2 (T75), v mediju DMEM/F12 z 10% FBS (DF medij). Pri poskusih smo uporabili celice nižjih pasaž, pasaže 4 ali 5. Začetna gostota nacepljanja celic je bila $7000 - 8000 \text{ celic}/\text{cm}^2$. S poskusom smo pričeli, ko so celice v gojilnih posodah dosegle vsaj 70% konfluenco.

3.5.11.2 Priprava kondicioniranega medija celic MSC

Celice MSC (MSC3 in MSC4) smo gojili v plastenkah velikosti 75 cm^2 (T75), v mediju z 10% FBS. Ko so celice dosegle konfluentno stanje ($>70\%$), smo jim za pripravo kondicioniranega medija odvzeli 12,5 mL medija (od skupno 15 mL).

Odvzeti medij smo nato centrifugirali 10 minut pri temperaturi 4°C in hitrosti 300g. Znižana temperatura pri centrifugiranju je potrebna zato, da preprečimo morebitno toplotno inaktivacijo dejavnikov v mediju. S centrifugiranjem pa smo iz medija odstranili odmrle celice in ostale nečistoče.

Sledilo je zamrzovanje medija na -80°C , vsak vzorec smo zamrznili v dveh alikvotih po 6mL. Tik pred samouporabo v poskusu, smo zamrznjen kondicioniran medij hitro odtalili v vodni kopeli (37°C).

3.5.11.3 Opis poskusa

Vsako izmed treh plstenek T75 s celicami GBM smo tretirali z drugačnim kondicioniranim medijem, eno z MSC3-CM (kondicionirani medij celic MSC3), drugo z MSC4-CM (kondicionirani medij celic MSC4) in tretjo plstenko z GBM-CM (kondicionirani medij celic GBM). Uporabljen medij je zmeraj vseboval normalen DMEM/F12 medij in kondicionirani medij. Medija smo vedno mešali v razmerju 1:1 (6mL DMEM/F12 in 6mL MSC-CM oz. 6mL DMEM/F12 in 6mL GBM-CM). Tako pripravljen medij smo celicam zamenjali po dveh dneh gojenja. Po tednu dni gojenja v kondicioniranem mediju smo celice GBM tripsinizirali in jih magnetno ločili za določanje % celic CD133+.

3.5.11.4 Magnetno ločevanje celic

Za magnetno ločevanje celic smo uporabili CD133 Cell Isolation Kit-a proizvajalca Miltenyi Biotec Inc., ZDA. Pred samo izvedbo magnetnega ločevanja smo celice GBM

tripsinizirali, saj se magnetno ločevanje izvaja s celičnimi suspenzijami. Po centrifugiranju (100 rpm, 5 min) smo celično suspenzijo resuspendirali v 1 mL DF medija. Sledila je 30-minutna inkubacija pri 37°C. Nato smo celice prešteli, centrifugirali (1000 rpm, 5 min) in jim odstranili DF medij. Na koncu smo celice GBM resuspendirali v 300 µL pufra MACS.

- a. **Princip magnetnega ločevanja:** Pri magnetnem ločevanju je potrebno celice CD133+ magnetno označiti. Označena celična frakcija se v magnetnem polju kolone zadrži, medtem ko celična frakcija CD133- kolono zapusti.
- b. **Magnetno označevanje:** Pri postopku magnetnega označevanja je pomembno, da delo poteka hitro in pri nizki temperaturi (4°C), zato smo cel postopek opravljali na ledu. Zaporedje korakov je bilo naslednje:
 - K 300 µL suspenzije celic GBM v pufru MACS smo dodali 100 µL FcR Blocking Reagent-a, ki inhibira nespecifično oz. s Fc-receptorjem posredovano vezavo protiteles na celice.
 - Celice smo označili z 100 µL CD133 MicroBeads in jih premešali. Sledila je 30- minutna inkubacija pri 4-8°C (v hladilniku).
 - Celice smo sprali z 5 mL pufra MACS in jih centrifugirali (300g, 10 min, 4°C).
 - Supernatant smo odpipetirali, pelet pa resuspendirali v 500 µL pufra MASC.
- c. **Magnetno ločevanje na MS koloni:** Za uspešno magnetno ločevanje celic je potrebno kolono pripraviti, zato smo jo sprali z zadostno količino pufra (500 µL) ter postavili v magnetno polje. Magnetno ločevanje je potekalo v naslednjih korakih:
 - Celotno celično suspenzijo označenih celic GBM (500 µL) smo nanesli na kolono.
 - Kolono smo spirali s 500mL pufra. Celice CD133-, ki so pri tem zapustile kolono, smo zbrali v epruveto.
 - Nato smo kolono odstranili iz magnetnega polja in jo sprali s 1000 µL pufra, pri čemer smo izolirali frakcijo celic CD133+ .
- d. **Kvantifikacija CD133+ celične frakcije:** Po magnetni separaciji smo obe celični frakciji, CD133+ in CD133-, centrifugirali (1000 rpm, 5 min), jima odstranili supernatant in ju resuspendirali v mediju DF. Sledilo je štetje celic posameznih frakcij s pomočjo hemocitometra.

4 REZULTATI

4.1 OCENA PROLIFERACIJSKEGA POTENCIALA CELIC MSC Z DOLOČANJEM PODVOJITVENEGA ČASA POPULACIJE (angl.«PDT»)

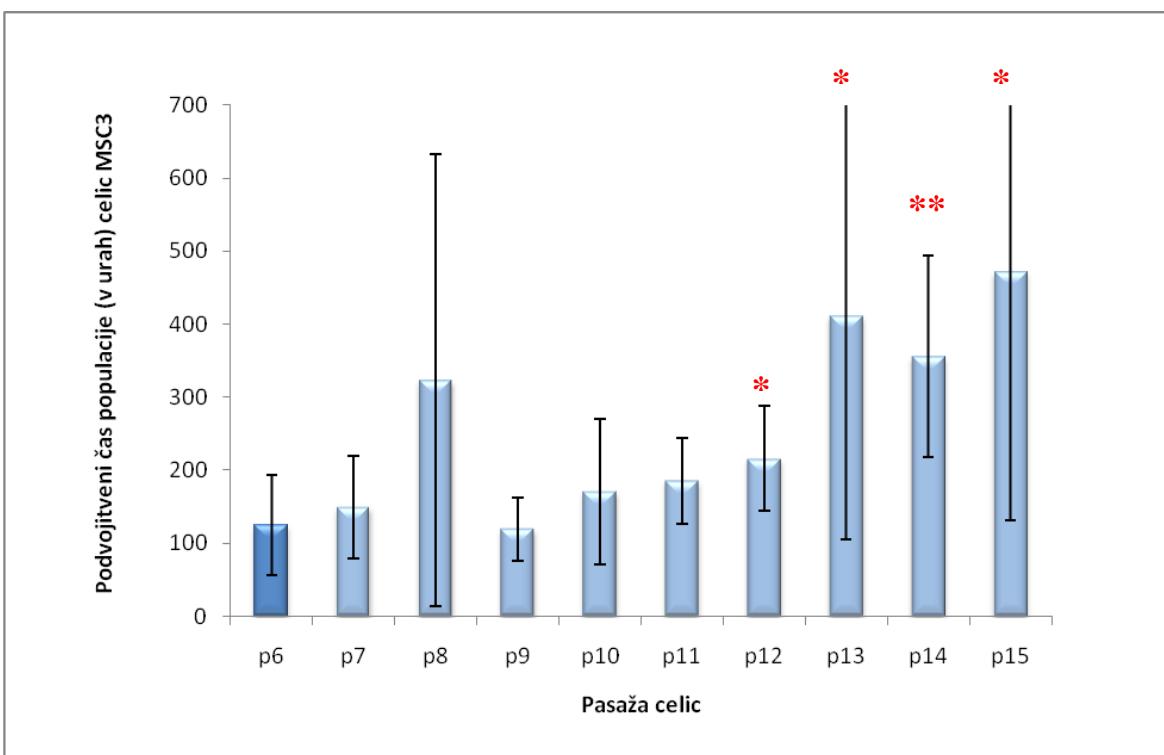
Proliferacijski potencial celic MSC smo določali s populacijskim podvojitvenim časom (PDT), ki smo ga izračunali po naslednji enačbi:

$$PDT = \frac{24 \times \text{stevilo dni v kulturi}}{(\text{Log}(\text{št. požetih celic}) - \text{Log}(\text{št. nasajenih celic})) \times 3,32}$$

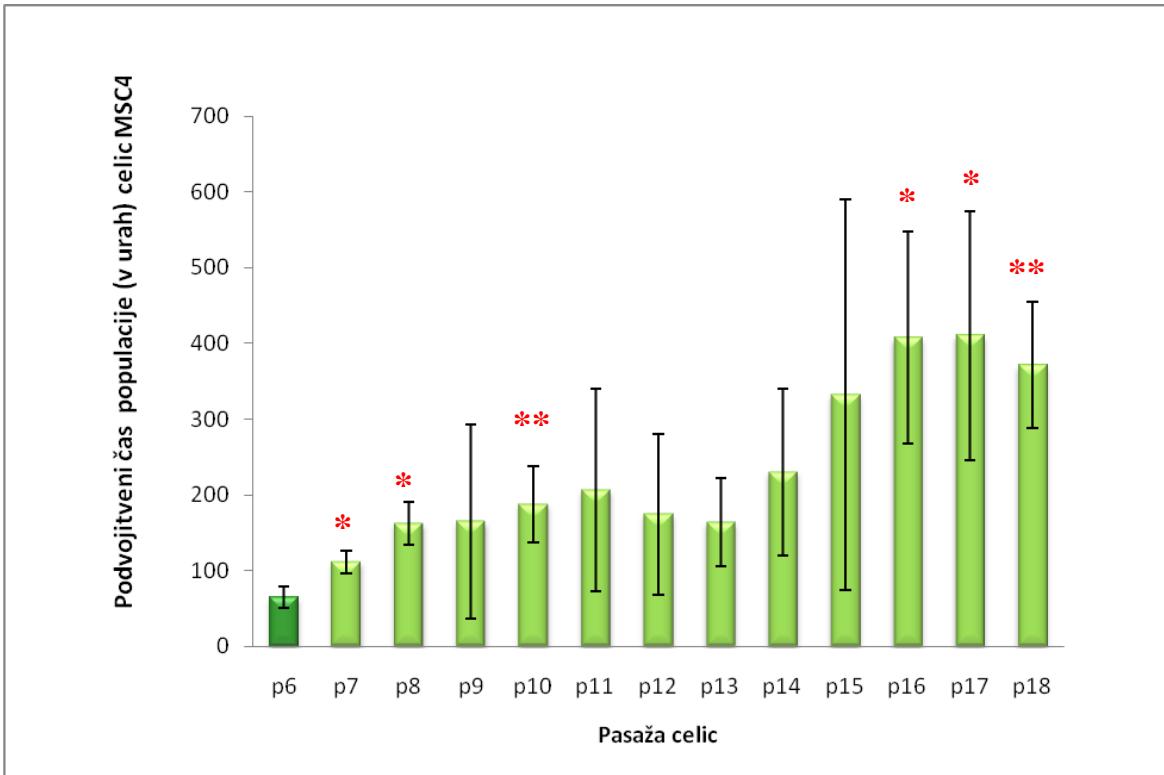
Celice MSC dveh linij (MSC3 in MSC4) smo gojili v gojitvenih posodicah T25 in T75. Z gojenjem celic smo pričeli pri pasaži 6. Pri posamezni pasaži smo imeli več vzorcev celic (vsaj 6), zato grafična predstavitev časov PDT vsake pasaže prikazuje povprečno vrednost teh vzorcev.

Naši rezultati kažejo, da se podvojitveni čas obeh linij celic MSC s časom podaljšuje. Pri začetnih pasažah se PDT postopoma povečuje, največji preskok je opazen pri pasaži 13. Na tej točki celice MSC3 za podvojitev potrebujejo približno štirikrat več časa kot so ga potrebovale pri pasaži 6 (slika 13).

Pri celicah MSC4 je padec proliferacijskega potenciala manjši kot pri celicah MSC3, saj pri pasaži 13 celice potrebujejo približno dvakrat več časa kot pri pasaži 6 (slika 14). Tudi pri višjih pasažah, ko se celice obeh linij zelo počasi delijo, opazimo, da imajo celice linije MSC3 nižji proliferacijski potenical kot celična linija MSC4. Na tej stopnji PDT celic MSC3 znaša okrog 500 ur, medtem ko pri celicah MSC4 vrednost PDT komaj presega 400 ur.



Slika 13: Podvojitveni čas celic MSC3 desetih zaporednih pasaž, z začetkom pri pasaži 6. Z izjemo pasaže 8, opazimo, da se z daljšim časom *in vitro* gojenja celic podaljšuje tudi čas potreben za podvojitev celične populacije (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).



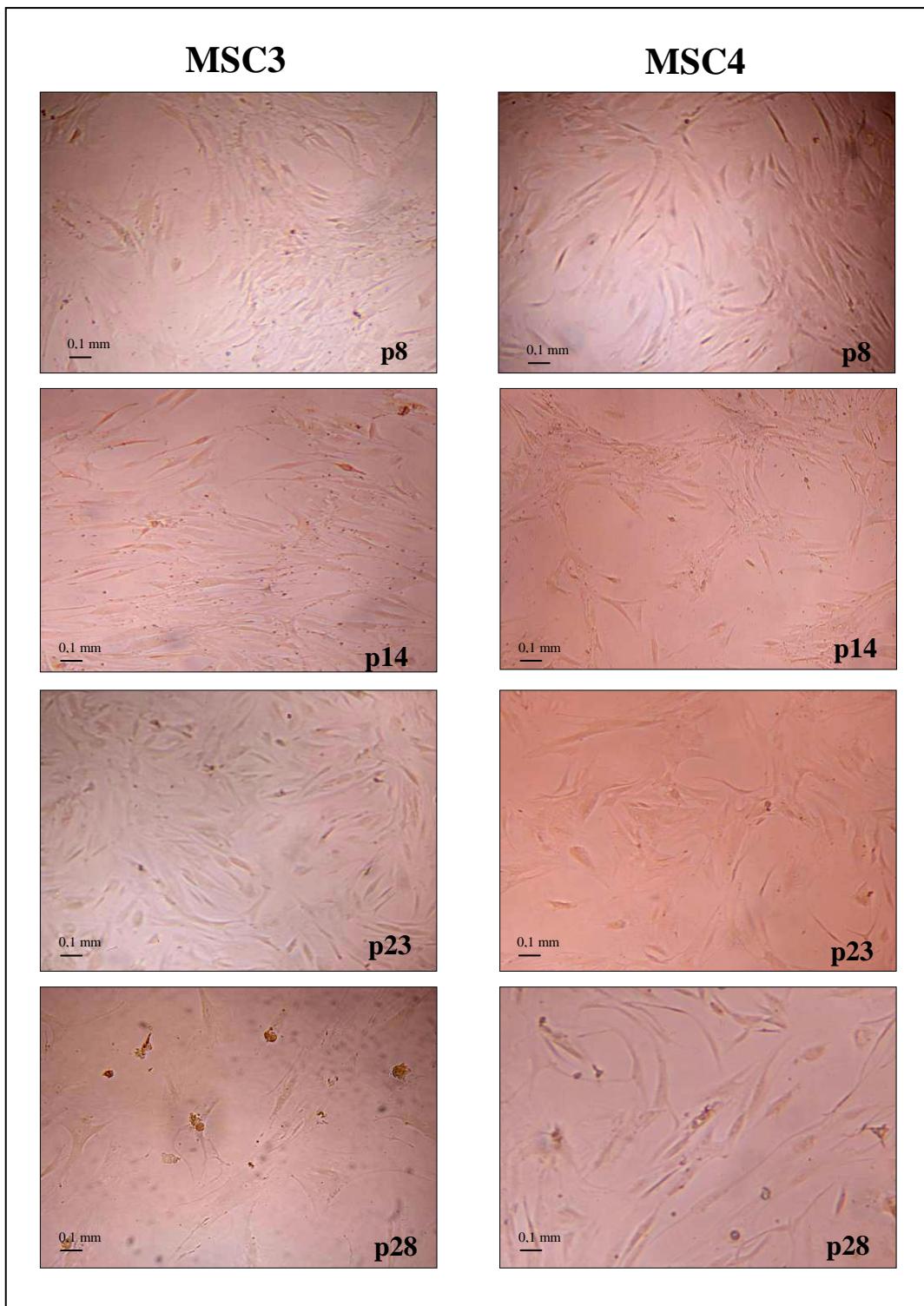
Slika 14: Podvojitveni čas celic MSC4 trinajstih zaporednih pasaž, z začetkom pri pasaži 6. Opazimo, da se z daljšim časom *in vitro* gojenja celic podaljšuje tudi čas potreben za podvojitev celične populacije (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

4.2 SPREMLJANJE MORFOLOŠKIH SPREMENB CELIC MSC Z UPORABO SVETLOBNEGA MIKROSKOPA

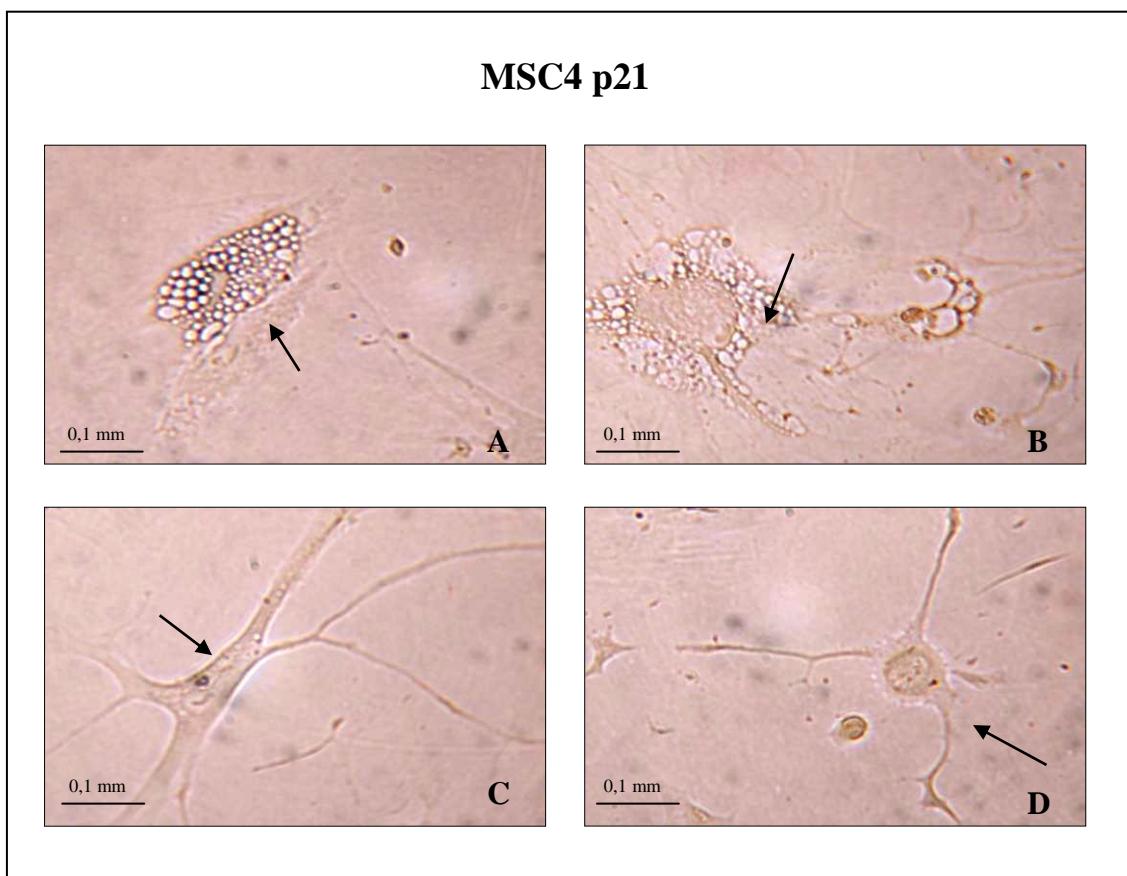
Daljše *in vitro* gojenje celic vpliva na morfologijo celic, zato smo vzporedno z določanjem proliferacijskega potenciala s svetlobnim mikroskopom opazovali tudi videz celic MSC.

Celice MSC so kompaktne, vretenaste oblike, pritrjujejo se na podlago in rastejo v monosloju. Ko celice MSC prerastejo gojitveno posodico, se zaradi kontaktne inhibicije njihova rast ustavi.

Celice MSC nižjih pasaž so podolgovate oblike. V celični kulturi so celice podobnega videza, gojitveno posodico preraščajo enakomerno in dokaj hitro. Drobirja ali plavajočih mrtvih celic ni opaziti (slika 15). Pri višjih pasažah se celice MSC spremenijo, postanejo bolj okrogle in večje (slika 15 in 16). V citoplazmi se pojavijo granule. Celice rastejo počasneje in v gojitveni posodici niso več enakomerno razporejene. Pojavijo se področja, kjer celice nimajo več videza celic MSC temveč bolj spominjajo na adipocite oz. nevrone. V tem primeru gre največkrat za odmiranje celic, kjer se od celic trga citoplazma oz. za celice (veliko vakuol) (slika 16). Dostikrat so prisotne plavajoče mrtve celice in celični drobir.



Slika 15: Dve liniji celic MSC (MSC3 in MSC4) pri različnih pasažah (p8, p14, p23 in p28) pri 100x povečavi. Prikazane so morfološke razlike med celicami nižjih in višjih pasaž. Pri višjih pasažah so celice večje in ne rastejo tesno skupaj, veliko je medceličnih prostorov. V gojitvenem mediju so dostikrat vidne nečistoče in plavajoče mrtve celice.



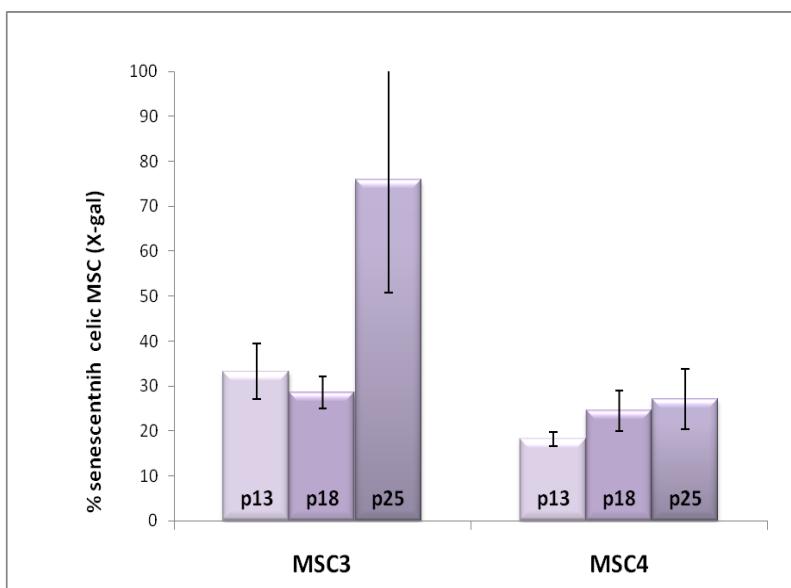
Slika 16: Morfologija celic MSC pri višjih pasažah - linija MSC4 pri pasaži 21. Nekatere celice se precej spremenijo in ne spominjajo več na celice MSC, bolj so podobne adipocitom (A, B) ali nevronom (C, D).

4.3 ANALIZA NASTOPA SENESCENCE V KULTURAHL CELIC MSC PRI DOLGOTRAJNEM *IN VITRO* GOJENJU

Nastop senescence celic MSC smo analizirali z barvanjem z X-gal. Dve liniji celic MSC (MSC3 in MSC4) smo gojili na plošči s štirimi jamicami. Poskuse smo izvedli v najmanj dveh paralelkah in dveh ponovitvah, pri tem smo uporabili celice treh pasaž p13, p18 in p25.

Iz rezultatov je razvidno (slika 17), da z daljšim *in vitro* gojenjem stopnja senescence celic MSC narašča. Celična linija MSC3 pri pasaži 13 vsebuje 33,25% senescentnih celic, pri pasaži 18 je odstotek senescentnih celic nekoliko nižji, 28,46%. Kasneje, pri pasaži 25 stopnja senescence močno naraste, na 76,01%. Opazimo tudi, da je pri liniji celic MSC3 delež senescentnih celic večji kot pri liniji MSC4.

Pri celični liniji MSC4 smo že na začetku, pri pasaži 13, določili nižjo stopnjo senescence, 18,24%, kot pri liniji MSC3 (33,25%). Pri pasaži 18 celična linija MSC4 vsebuje nekoliko več senescentnih celic, 24,50%. Pri končni pasaži 25 pa smo določili, da je senescentnih celic 27,14%.



Slika 17: Ocena senescence populacije celic MSC3 in MSC4. Rezultat je prikazan kot % senescentnih celic glede na skupno število celic v celični populaciji. Senescenco smo določali pri treh pasažah (p13, p18 in p25) s pomočjo barvanja z Xgal. Opazimo, da se senescenca obeh linij celic MSC z daljšim *in vitro* gojenjem povečuje.

4.4 ANALIZA DIFERENCIACIJSKEGA POTENCIALA CELIC MSC

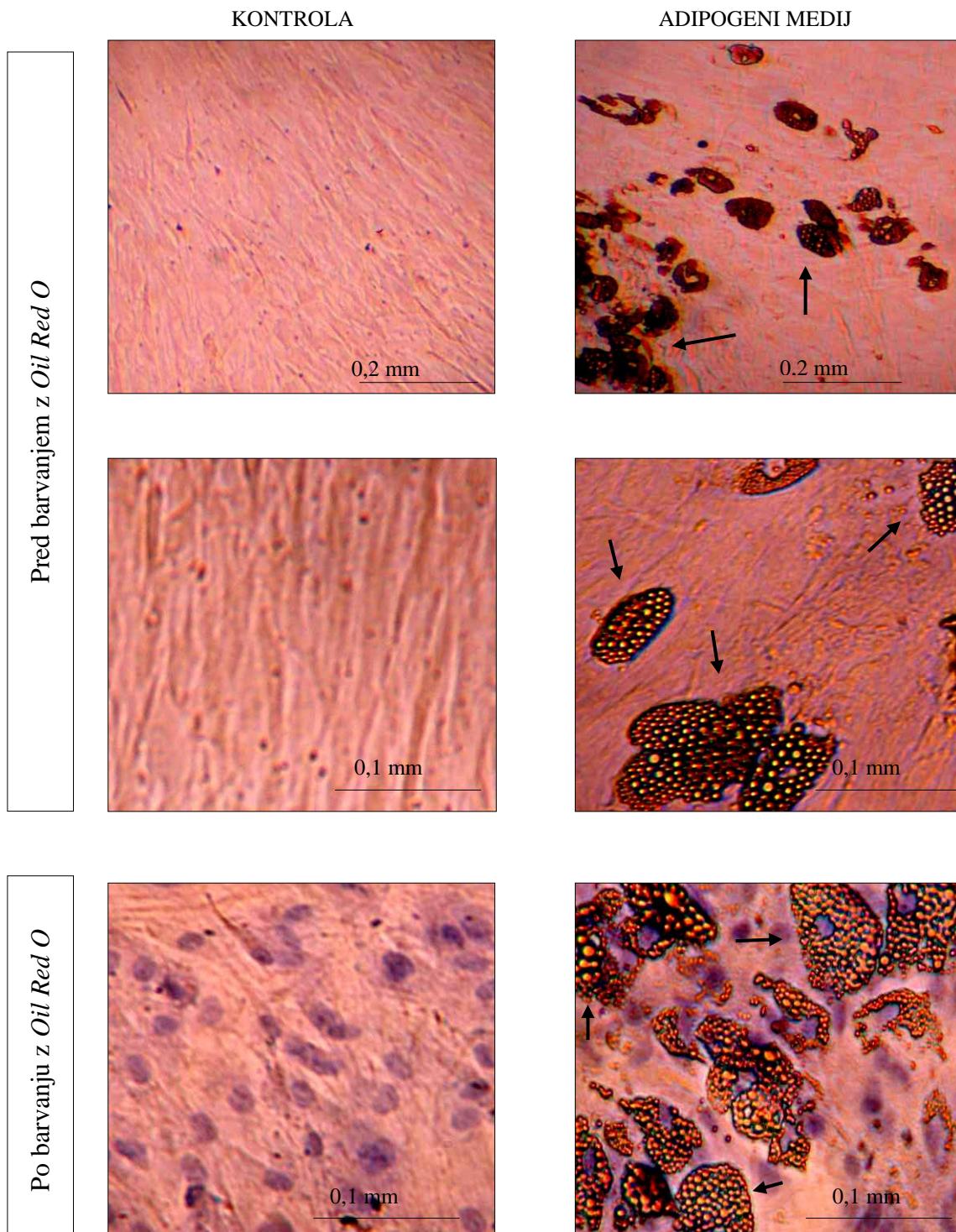
Poskuse adipogene, hondrogene in osteogene diferenciacije smo izvedli na dveh celičnih linijah celic MSC – MSC3 in MSC4. Poskusi z linijo MSC3 so potekali pri pasaži 7, medtem ko smo pri liniji MSC4 uporabili celice pasaže 8.

4.4.1 Adipogena diferenciacija

Adipogeno diferenciacijo celic MSC smo inducirali z indometacinom. Pojav znotrajceličnih maščobnih vakuol smo detektirali z »Oil Red O« - lipofilnim barvilom, ki maščobe obarva rdeče.

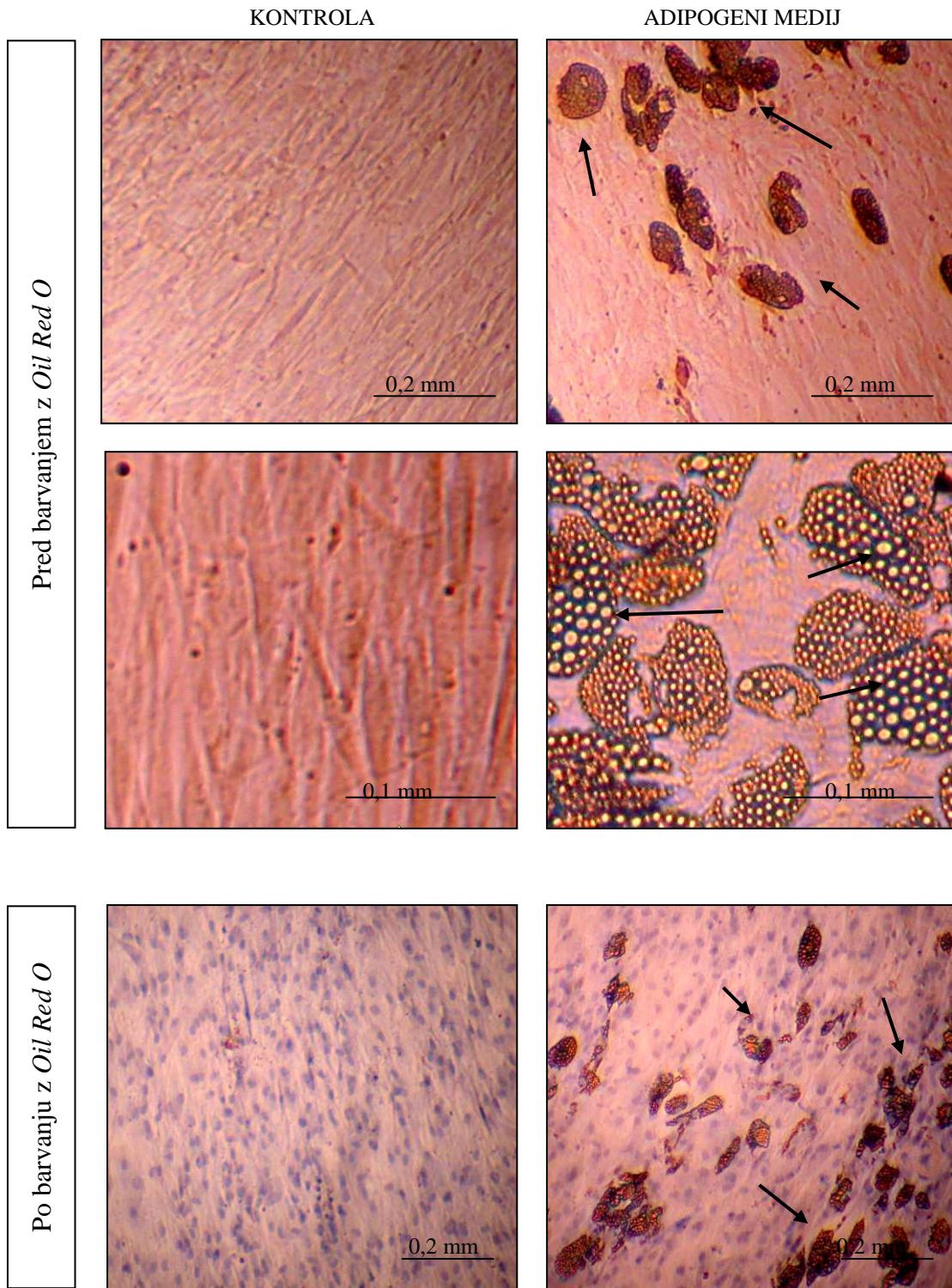
Na slikah 18 in 19 so predstavljeni rezultati poskusov adipogene diferenciacije celic MSC3 (slika 18) in MSC4 (slika 19). Pri obeh linijah celic MSC so se v vzorcih tretiranih z indometacinom pojavile maščobne vakuole. Pri kontrolnih celičnih kulturah, maščobnih vakol ni bilo. Pri obeh linijah MSC, MSC3 in MSC4, je adipogena diferenciacija potekla zelo podobno. Videz celičnih kultur in količina nastalih maščobnih kapljic pri celicah MSC3 in MSC4 sta bila primerljiva.

MSC3 p7 ADIPOGENA DIFERENCIACIJA



Slika 18: Inducirana adipogena diferenciacija celic MSC3 pri pasaži 7. Izpostavitev indometacinu je pri testnih vzorcih povzročila nastanek maščobnih vakuol (→), ki so bile vidne že pred barvanjem z »Oil Red O«. Pri celicah, ki so služile kot kontrola do nastanka maščobnih vakuol ni prišlo.

MSC4 p8 ADIPOGENA DIFERENCIACIJA

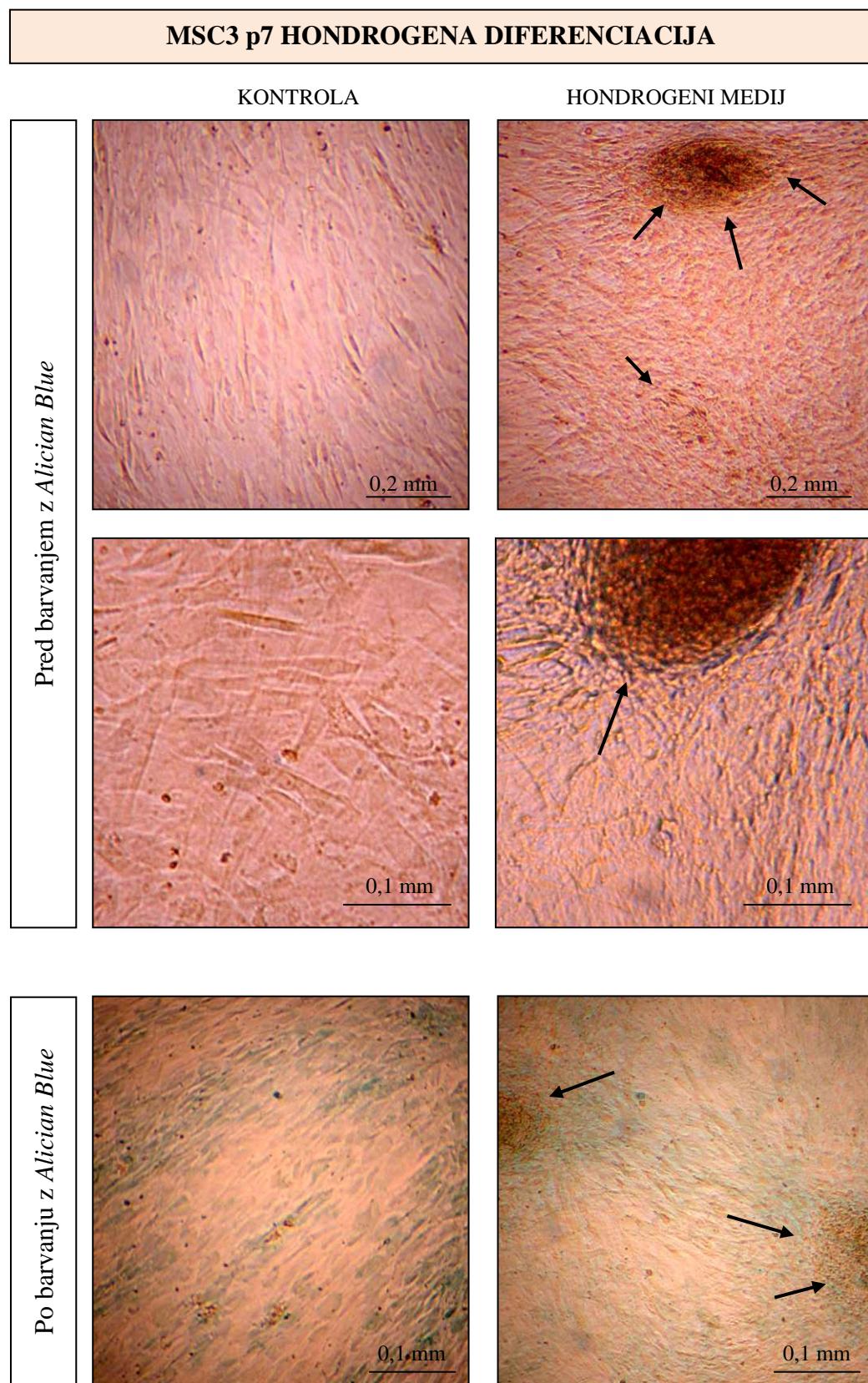


Slika 19: Inducirana adipogena diferenciacija celic MSC4 pri pasaži 8. Izpostavitev indometacinu je pri testnih vzorcih povzročila nastanek maščobnih vakuol (\rightarrow), ki so bile vidne že pred barvanjem z »Oil Red«. Pri celicah, ki so služile kot kontrola do nastanka maščobnih vakuol ni prišlo.

4.4.2 Hondrogena diferenciacija

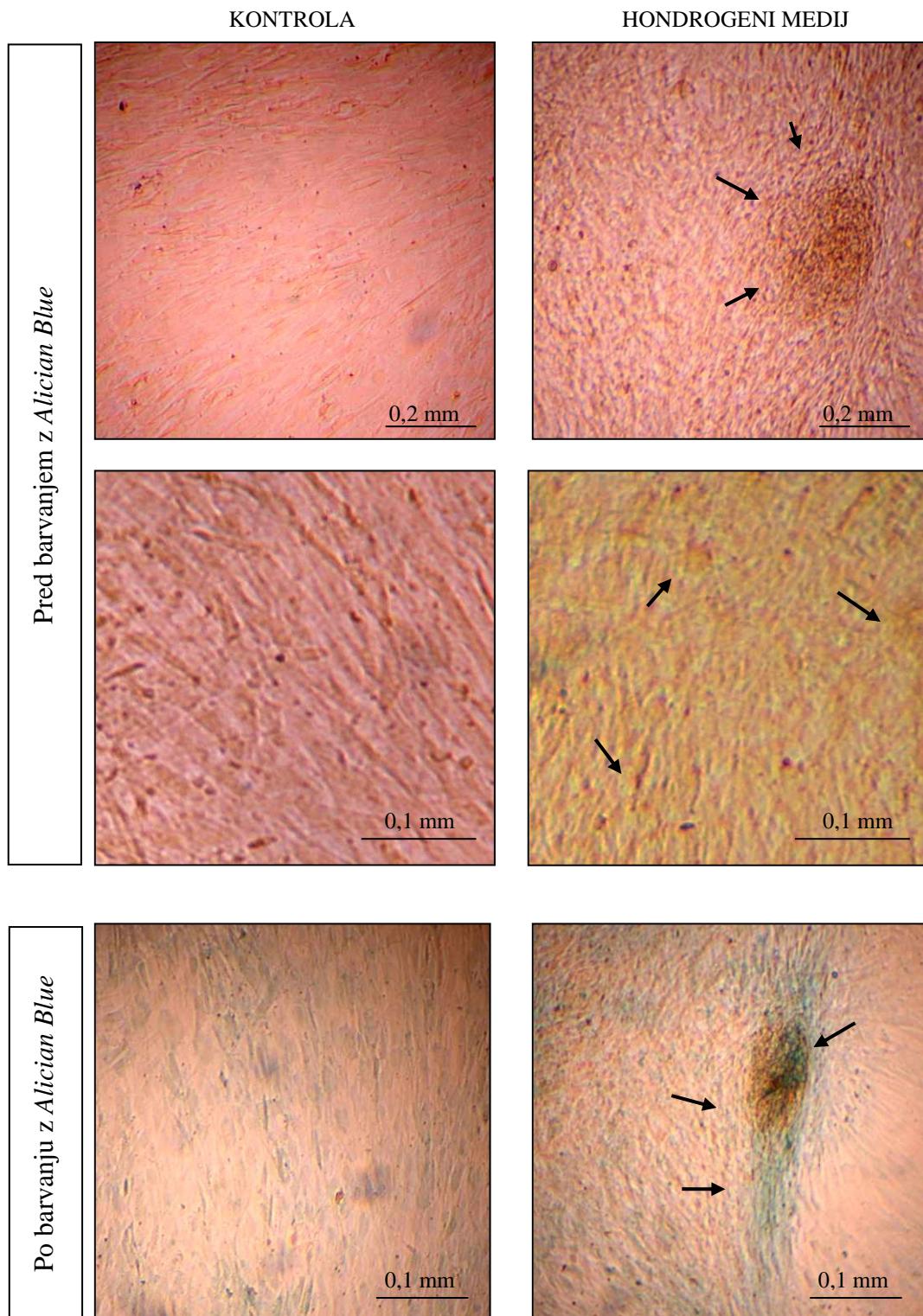
Hondrogeno diferenciacijo celic MSC smo dosegli z medijem, ki je vseboval TGF β 3 in askorbinsko kislino. Tvorbo elementov zunajceličnega matriksa hrustančnega tkiva, predvsem mukopolisaharidov in glikozaminoglikanov, smo detektirali z barvanjem z *Alician Blue*.

Na slikah 20 in 21 so predstavljeni rezultati poskusov hondrogene diferenciacije celic MSC dveh linij - MSC3 (slika 20) in MSC4 (slika 21). V vzorcih obeh celičnih linij, ki smo jih tretirali z TGF β 3 in askorbinsko kislino je hondrogena diferenciacija uspešno potekla. Za razliko od kontrolnih vzorcev, tretirane celice niso bile podolgovate, na določenih področjih pa smo opazili še posebej veliko celičnih skupkov, ki jih pripisujemo hondrogenemu fenotipu. Po barvanju z *Alician Blue* so se elementi zunajceličnega matriksa, ki so značilni za hrustančno tkivo, obarvali modro. To je bilo zlasti opazno pri celicah MSC3, kjer je hondrogena diferenciacija potekla v nekoliko večjem obsegu kot pri celicah MSC4.



Slika 20: Inducirana hondrogena diferenciacija celic MSC3 pri pasaži 7. Izpostavitev TGF β 3 in askorbinski kislini je pri testnih vzorcih povzročila nastanek hrustančnega fenotipa. Temna področja (→) predstavljajo elemente zunajceličnega matriksa hrustančnega tkiva, ki jih pri kontrolnih vzorcih nismo opazili.

MSC4 p8 HONDROGENA DIFERENCIACIJA

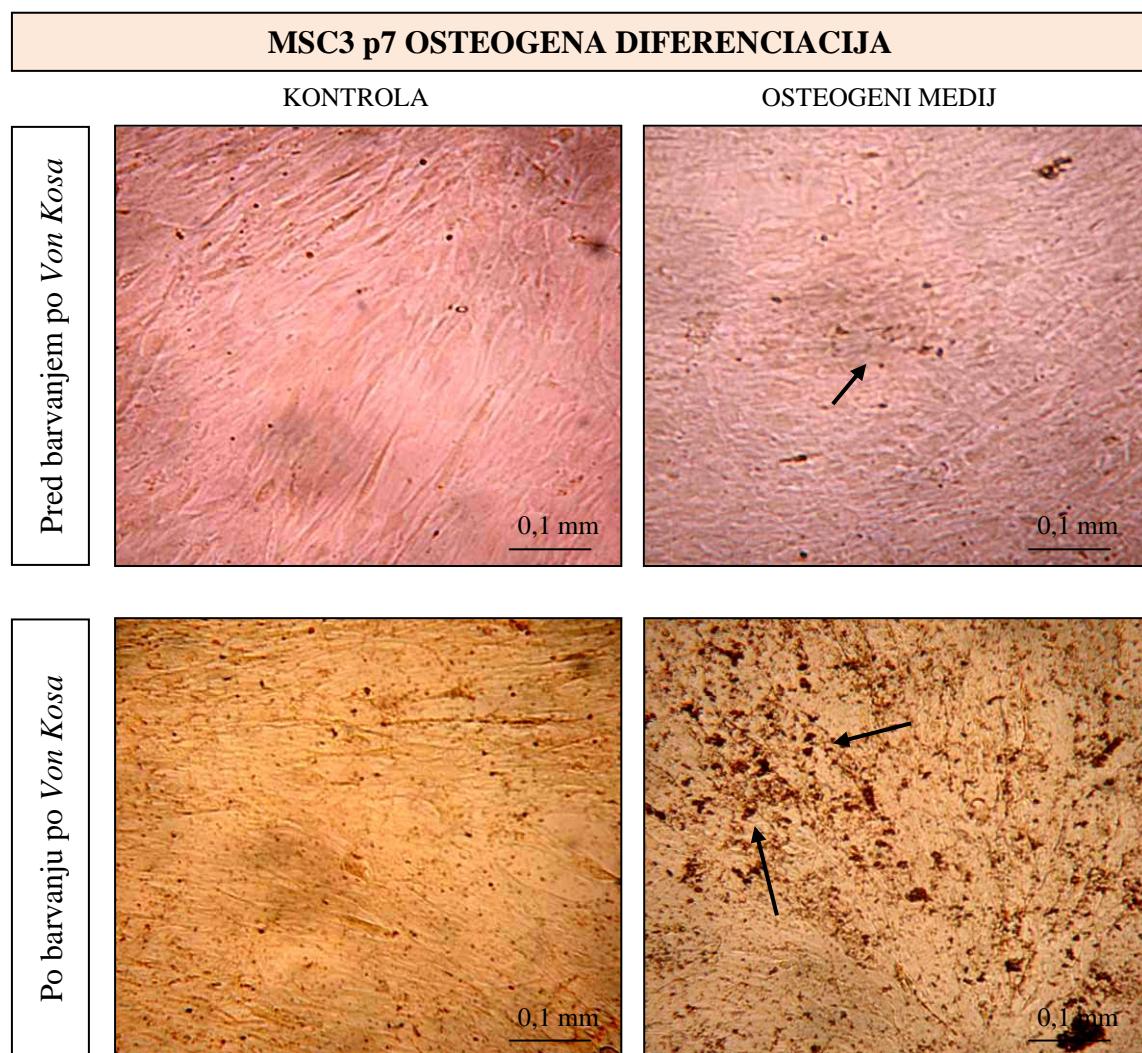


Slika 21: Inducirana hondrogena diferenciacija celic MSC4 pri pasaži 8. Izpostavitev TGF β 3 in askorbinski kislini je pri testnih vzorcih povzročila nastanek hrustančnega fenotipa. Temna področja (→) predstavljajo elemente zunajceličnega matriksa hrustančnega tkiva, ki jih pri kontrolnih vzorcih nismo opazili.

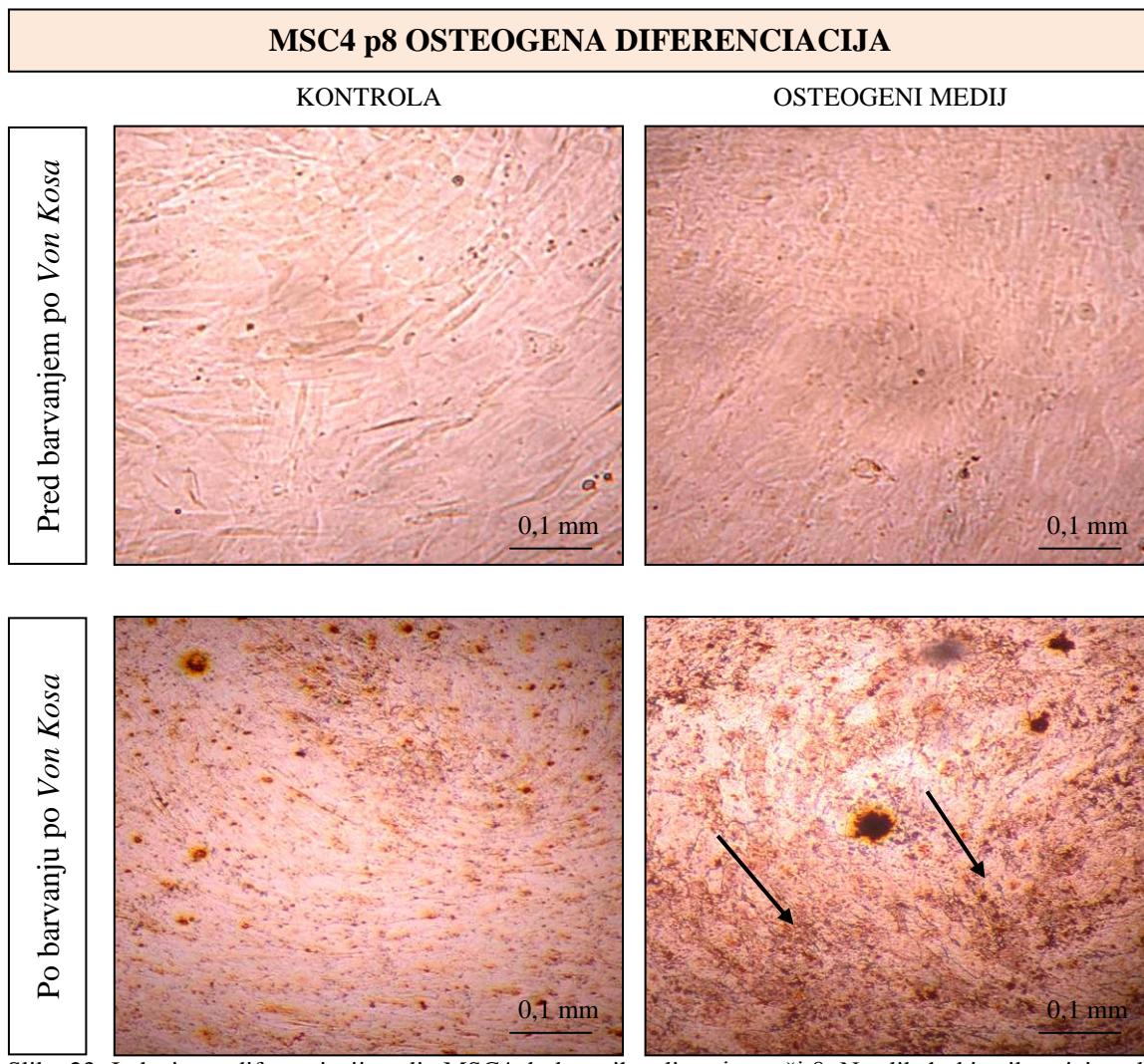
4.4.3 Osteogena diferenciacija

Osteogeno diferenciacijo celic MSC smo inducirali z medijem, ki je vseboval deksametazon, askorbinsko kislino in glicerofosfat. Za detekcijo kalcijevih depozitov, ki so tipični elementi kostnega tkiva, smo se poslužili barvanja po Von Kossa.

Na slikah 22 in 23 so predstavljeni rezultati poskusov osteogene diferenciacije celic MSC3 (slika 22) in MSC4 (slika 23). Pri obeh celičnih linijah so se tretirane celične kulture v primerjavi s kontrolnimi vzorci morfološko spremenile. Celice niso bile več podolgovate oblike, zmanjšale so se in postale so bolj okrogle. V testnih vzorcih obeh celičnih linij smo po barvanju po Von Kossa detektirali kalcijeve depozite, ki so se pobarvali črno. Pri celicah MSC3 je osteogeneza bolj uspešno potekla, saj je bilo pri njih črno obarvanih depozitov znatno več kot pri celicah MSC4.



Slika 22: Inducirana diferenciacija celic MSC3 pri pasaži 7 do kostnih celic. Na slikah, ki prikazujejo celice izpostavljene osteogenemu mediju so vidni črno obarvani kalcijevi depoziti (→).



Slika 23: Inducirana diferenciacija celic MSC4 do kostnih celic pri pasaži 8. Na slikah, ki prikazujejo celice izpostavljenе osteogenemu mediju so vidni črno obarvani kalcijevi depoziti (→).

4.5 DOLOČANJE VPLIVA KONDICIONIRANEGA MEDIJA CELIC MSC NA BOGATENJE KULTURE CELIC GBM S POPULACIJO CELIC CD133+

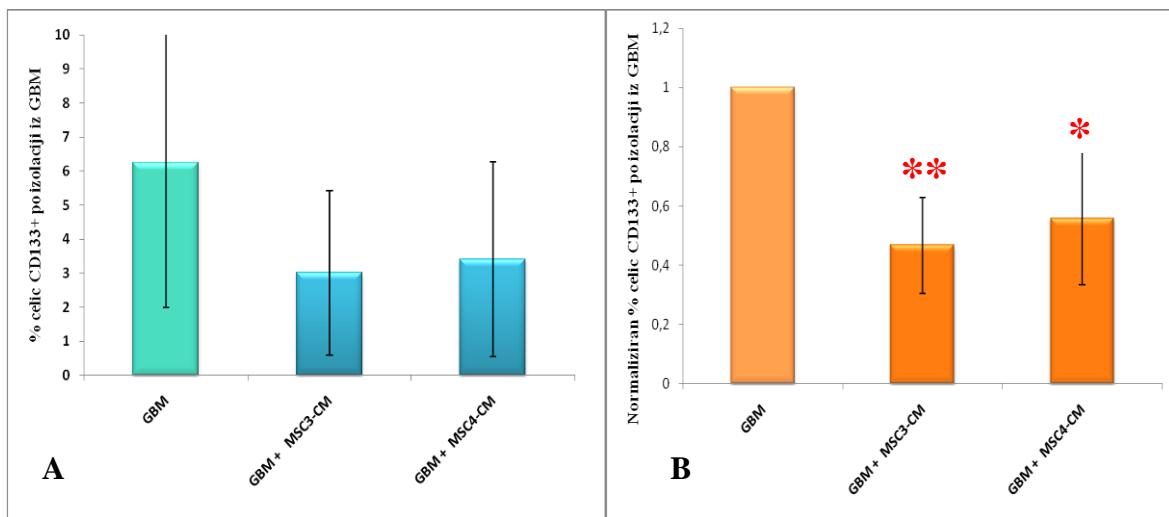
Iz rezultatov podanih v preglednici 14 in na slikah 24 ter 25 je razvidno, da je v vzorcih celic GBM tretiranimi s kondicioniranim medijem celic MSC odstotek z magnetnim ločevanjem izoliranih celic CD133+ bil manjši kot pri vzorcih celic GBM, ki so bile v lastnem kondicioniranem mediju. V kontrolnih vzorcih je populacija celic CD133+ predstavljala 6,2% skupnega izplena celic. Pri vzorcih, kjer smo uporabili kondicionirani medij celic MSC, je delež celic CD133+ po magnetni separaciji bil manjši, 3,01% pri uporabi MSC3-CM in 3,41% pri MSC4-CM (slika 24A). Zaradi precejšnje variabilnosti števila izoliranih celic med posameznimi poskusi (slika 27) smo določene % celic CD133+ testnih vzorcev normalizirali glede na % celic CD133+ v kontrolnem vzorcu (slika 24B). Tako smo ugotovili, da celice MSC zavirajo proliferacijo celic CD133+, saj je opaženo zmanjšanje deleža celic CD133+ po tretiranju z obema MSC-CM, MSC3-CM in MSC4-CM signifikantno. Pri predstavivti % celic CD133- smo se prav tako poslužili normalizacije na enak način (slika 25B).

Preglednica 14: Vpliv kondicioniranega medija dveh linij celic MSC (MSC3-CM in MSC4-CM) na zastopanost (%) celične subpopulacije CD133+ v primarni kulturi celic GBM. Poskus smo ponovili trikrat.

% CD133+	GBM (%)	GBM + MSC3-CM (%)	GBM + MSC4-CM (%)
1. ponovitev	9,091	3,101	3,004
2. ponovitev	1,353	0,557	0,767
3. ponovitev	8,284	5,383	6,452
povprečje	6,243	3,013	3,408
st. odklon	4,254	2,414	2,864
T-test		0,317	0,392

Preglednica 15: Normalizirane vrednosti rezultatov predstavljenih v preglednici 14.

% CD133+	GBM	GBM + MSC3-CM	GBM + MSC4-CM
NORMALIZIRANE VREDNOSTI			
1. ponovitev	1	0,341	0,330
2. ponovitev	1	0,411	0,567
3. ponovitev	1	0,649	0,778
povprečje	1	0,467	0,558
st. odklon	0	0,161	0,224
T-test		0,004	0,027



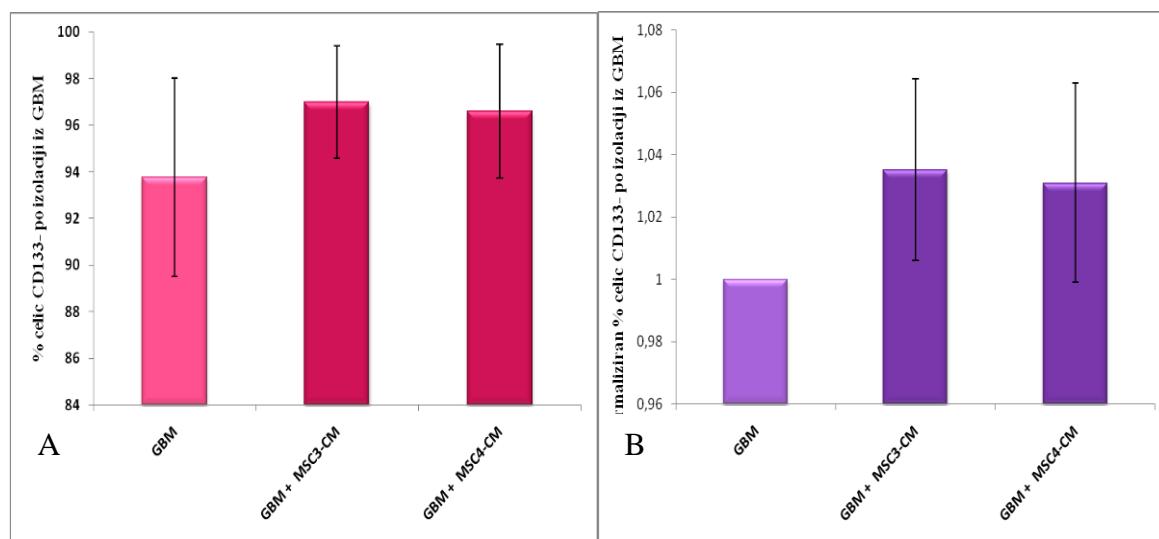
Slika 24: A) Vpliv kondicioniranega medija dveh linij celic MSC (MSC3-CM in MSC4-CM) na zastopanost (%) celične subpopulacije CD133+ v primarni kulturi celic GBM. Delež (%) celic CD133+ v posameznem stolpcu predstavlja povprečno vrednost % števila izoliranih celic CD133+ v treh poskusih. B) Prikazane vrednosti so normalizirane glede na kontrolni vzorec. Celice CD133+ smo izolirali z magnetnim ločevanjem. Opazimo, da je % celic CD133+ v kulturah tretiranimi s kondicionirani mediji celic MSC3-CM in MSC4-CM v primerjavi s kontrolo nižji (*p<0,05; **p<0,01).

Preglednica 16: Vpliv kondicioniranega medija dveh linij celic MSC (MSC3-CM in MSC4-CM) na zastopanost (%) celične subpopulacije CD133- v primarni kulturi celic GBM. Poskus smo ponovili trikrat.

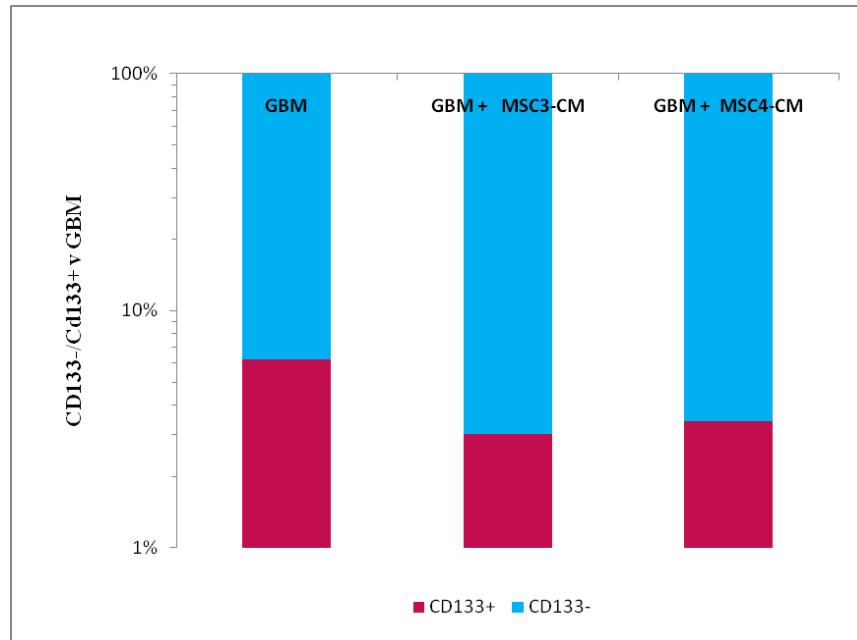
% CD133-	GBM (%)	GBM + MSC3-CM (%)	GBM + MSC4-CM (%)
1. ponovitev	90,909	96,899	96,996
2. ponovitev	98,647	99,443	99,233
3. ponovitev	91,716	94,617	93,548
povprečje	93,757	96,987	96,592
st. odklon	4,254	2,414	2,864
T-test		0,317	0,392

Preglednica 17: Normalizirane vrednosti rezultatov predstavljenih v preglednici 16.

% CD133- NORMALIZIRANE VREDNOSTI	GBM	GBM + MSC3-CM	GBM + MSC4-CM
1. ponovitev	1	1,065	1,067
2. ponovitev	1	1,008	1,005
3. ponovitev	1	1,031	1,020
povprečje	1	1,035	1,031
st. odklon	0	0,029	0,032
T-test		0,104	0,168

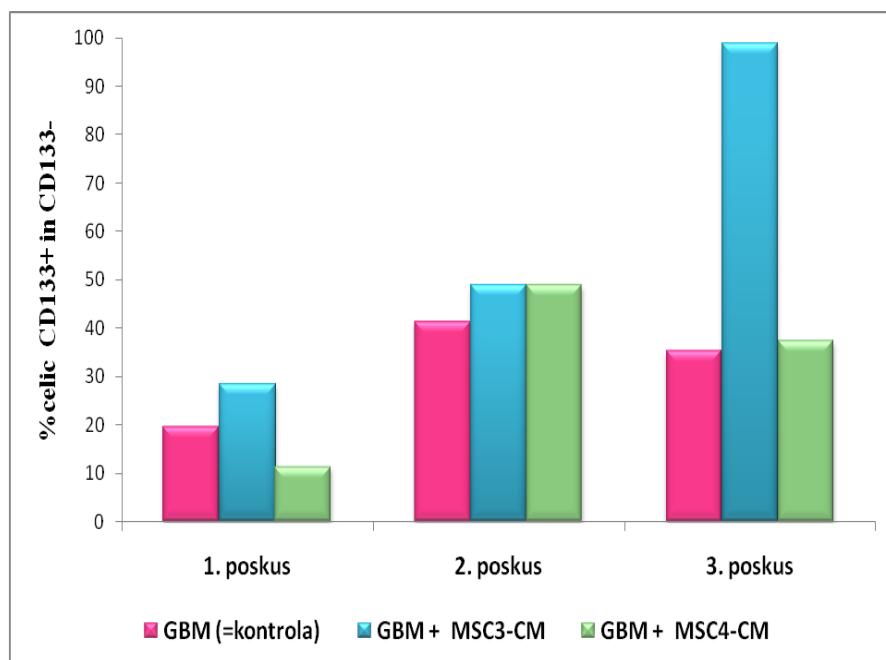


Slika 25: A) Vpliv kondicioniranega medija dveh linij celic MSC (MSC3-CM in MSC4-CM) na zastopanost (%) celične subpopulacije CD133- v primarni kulturi celic GBM. Delež (%) celic CD133- v posameznem stolpcu predstavlja povprečno vrednost % števila izoliranih celic CD133+ v treh poskusih. B) Prikazane vrednosti so normalizirane glede na kontrolni vzorec. Celice CD133+/- smo izolirali z magnetnim ločevanjem. Opazimo, da je v primerjavi s kontrolo, v kulturah tretiranimi s kondicioniranim medijem celic MSC % celic CD133- večji.



Slika 26: Razmerje (v %) na logaritemski skali med celicami CD133- in CD133+ v primarni kulturi celic GBM po tretiranju s kondicioniranimi mediji: pri kontroli smo uporabili kondicionirani medij celic GBM, pri tretiranih vzorcih pa kondicionirana medija dveh linij celic MSC, MSC3-CM in MSC4-CM. Pri celicah GBM tretiranimi s MSC-CM je % izoliranih celic CD133+ bil manjši kot pri kontroli. Delež (%) celic CD133+ v posameznem stolpcu predstavlja povprečno vrednost % števila izoliranih celic CD133+ v treh poskusih. Metoda izolacije celic CD133+ je bila magnetno ločevanje na MS koloni.

Pred magnetnim ločevanjem smo skupno število celic GBM določili s štetjem na hemocitometru. Na enak način smo po magnetnem ločevanju določili število obeh celičnih frakcij, CD133+ in CD133-. Skupno število celic GBM po magnetnem ločevanju ozira skupni izplen celic smo definirali kot vsoto števila celic obeh celičnih frakcij (CD133+ in CD133-). Tako smo ugotovili, da smo z magnetnim ločevanjem izgubili veliko celic (slika 27), saj nam je po njej uspelo pridobiti največ 50% izhodiščnega števila celic GBM. Opazili smo tudi, da se je izplen celic GBM po magnetnem ločevanju med posameznimi poskusi močno razlikoval. Tako smo pri prvem poskusu imeli bistveno manj celic kot pri preostalih dveh poskusih.



Slika 27: Delež (%) števila celic GBM (vsota celic CD133+ in CD133-) izoliranih z magnetnim ločevanjem glede na izhodiščno število celic. Izplen celic je prikazan za primarne kulture celic GBM gojene z ustreznimi kondicioniranimi mediji, v treh ponovitvah.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 OCENA PROLIFERACIJSKEGA POTENCIALA CELIC MSC Z DOLOČANJEM PODVOJITVENEGA ČASA POPULACIJE (ANGL.«PDT»)

Dobro poznavanje lastnosti celic MSC je pogoj za njihovo uporabo v terapevtske namene. Pri diplomski nalogi smo za določanje proliferacijskega potenciala celic MSC uporabili dve celični liniji, MSC3 in MSC4, izolirani iz kostnega mozga različnih, zdravih donorjev. Proliferacijski potencial celic MSC smo določali skozi daljše časovno obdobje, in sicer 6 mesecev. Celice MSC3 in MSC4 smo začeli gojiti pri pasaži 6, vrednosti PDT pa smo pri celicah MSC3 spremeljali vse do pasaže 15 (slika 13) in pri celicah MSC4 do pasaže 18 (slika 14).

Pri obeh celičnih linijah MSC so se z daljšim časom *in vitro* gojenja populacijski podvojitveni časi podaljševali. Za celično linijo MSC3 smo tako določili, da vrednost PDT pri pasaži 6 presega 100 ur, pri zadnji pasaži, pasaži 15 pa se PDT podaljša na približno 500 ur ($p<0,05$). Celice linije MSC4 pri pasaži 6 za podvojitev potrebujejo okrog 60 ur, kar je manj kot pri celični liniji MSC3. Pri poznih pasažah, od pasaže 15 dalje se vrednost PDT giblje okrog 400 ur ($p<0,05$). Prikazani rezultati (slika 13 in 14) niso statistično signifikantni pri vseh pasažah, še zlasti ne pri nižjih pasažah celic linije MSC3.

Naša opažanja so v skladu s pričakovanji, saj je znano, da starejše celične kulture odlikuje počasna celična rast in delitev in s tem povezana zmanjšana proliferacijska sposobnost (Gang in sod., 2004; Nakamizo in sod., 2005). Nekateri avtorji navajajo, da je celice MSC brez spremembe proliferacijske kapacitete moč gojiti vse do 30 pasaže (Gang in sod., 2004; Kern in sod., 2006). Pri naših celičnih linijah je bil padec proliferacijske kapacitete celic opazen že mnogo prej. Od pasaže 6 navzgor so imele celice vseh nadaljnjih pasaž nižjo proliferacijsko kapaciteto in zato višji PDT. Yeon in sod. so podobno kot mi opazili, da do padca proliferacijske kapacitete celic MSC pride dokaj hitro. V njihovem poskusu se je proliferativna kapaciteta celic MSC, ki so jo določali z označevalcem proliferacije BrdU, med pasažo 2 in 10 zmanjšala za okrog 50% (Yeon in sod., 2006). Z še manjšim proliferacijskim potencialom celic MSC so se srečali Banfi in sod., saj so določili, da je podvojitveni čas primarne kulture celic MSC 36 ur, kasneje, pri pasaži 5 pa ta znaša že okrog 380 ur (Banfi in sod., 2000).

Tudi v *in vivo* pogojih prihaja do padca proliferacijske kapacitete celic MSC. Stenderup in sod. so primerjali lastnosti celic MSC, ki izvirajo iz mladih in starih donorjev in so ugotovili, da se proliferacijski potencial celic iz obeh virov razlikuje. Celice MSC izolirane iz mladih donorjev (18-29 let) so imele PD vrednost $0,09 \pm 0,02$ PD/dan, kar pomeni, da PD doseže vrednost 1 (podvojitev celične populacije) v 267 urah. Pri celicah MSC, ki so izvirale iz starejših donorjev (66-81 let) je dnevna stopnja PD znašala $0,05 \pm 0,02$ PD/dan, oz. PD doseže vrednost 1 v 480 urah (PD= $\log N / \log 2$, pri čemer je N razmerje med številom celic v konfluentni kulturi in začetnim številom nasajanja celic) (Stenderup in sod., 2003). Celice MSC, ki smo jih uporabljali pri diplomskem delu so bile izolirane iz

dokaj mladih donorjev (celice MSC3 so bile izolirane iz 22 let starega donorja, celice MSC4 pa iz 33 let starega donorja), zato so naše celične kulture imele v primerjavi z navedeno raziskavo nižjo proliferacijsko kapaciteto.

V naših poskusih je vrednost PDT obeh celičnih linij MSC enakomerno naraščala, izjema je le pasaža 8 pri celicah MSC3. Na tej točki smo celicam določili nepričakovano visoko vrednost PDT, ki odstopa od splošnega trenda naraščanja PDT in ki pri poznejših pasažah celic MSC3 ni več opazen. Ta neskladnost se odraža tudi na velikem standardnem odklonu, zato bi bilo to časovno točko, pasažo 8 bolje zanemariti. Predvidevamo, da bi vzrok temu lahko bile morebitne napake pri štetju celic, ki se v primeru manjšega števila vzorcev celic hitro odrazijo na vrednost PDT.

Proliferacijski potencial celic MSC definira donor in tkivno mikrookolje, iz katerega so celice izolirane (Gang in sod., 2004; Motaln in sod., 2010). Tudi pri našem poskusu smo opazili, da celični liniji MSC3 in MSC4 nimata enakega proliferacijskega potenciala. Celicam MSC3 smo v primerjavi s celično linijo MSC4 vseskozi, tako pri nižjih kot pri višjih pasažah, določili nižjo vrednost PDT. Celice obeh linij smo gojili sočasno in pod enakimi pogoji, zato vse morebitne razlike izhajajo iz celic samih in niso posledica gojenja celic.

Zaradi velike variabilnosti celic MSC, ki smo jo opazili pri naših vzorcih, se je pred dejansko uporabo celic MSC v terapevtske namene potrebno posvetiti ovrednotenju njihovih proliferacijskih lastnosti. Padec proliferacijske kapacitete celic višjih pasaž je pri delu s celicami MSC omejujoči dejavnik, zato so za terapevtsko uporabo dosti bolj primerne celice MSC nižjih pasaž izolirane iz mlajših donorjev (Nakamizo in sod., 2005).

Pri gojenju in proučevanju proliferacijskega potenciala celic MSC transformacije, ki bi se odrazila z nenadnim povečanjem proliferacije celic (in z močno znižanim PDT), nismo opazili. To je v skladu z ugotovitvijo, da se celice MSC *in vitro* ne transformirajo (Bernardo in sod., 2007). Pri doslej domnevnih primerih transformacije celic MSC se je izkazalo (z analizami genskega profila celic), da so se pravzaprav zgodile navzkrižne okužbe z drugimi, hitro rastočimi celičnimi linijami (Garcia in sod., 2010, Torsvik in sod., 2010).

5.2 ANALIZA NASTOPA SENESCENCE PRI DOLGOTRAJNEM *IN VITRO* GOJENJU CELIC MSC

Določanje proliferacijskega potenciala celic MSC iz kostnega mozga je odkrilo, da se lastnosti posameznih linij celic MSC lahko razlikujejo. Prav zato sem v okviru diplomske naloge želeta dodatno raziskati, kdaj pri uporabljenih celicah MSC nastopi replikativna senescanca.

Nastop senescence smo določali z encimom β -galaktozidaza, ki je v senescentnih celicah zelo aktivna. Aktivnost β -galaktozidaze smo merili s kromogenim substratom X-gal, ki ga β -galaktozidaza razgradi do modroobarvanega produkta. Zaradi tega se tudi senescentne celice ob dodatku X-gal obarvajo modro, medtem ko ostale, vitalne celice ostanejo

brezbarvne. Stopnjo senescence smo ocenili pri dveh celičnih linijah MSC - MSC3 in MSC4 in to pri pasažah 13, 18 in 25.

V naših poskusih se je pri obeh linijah izkazalo (slika 17), da z daljšim *in vitro* gojenjem stopnja senescence celic MSC narašča. Celična linija MSC3 pri pasaži 13 vsebuje 33,25% senescentnih celic, pri pasaži 18 je odstotek senescentnih celic nekoliko nižji - 28,46%. Kasneje, pri pasaži 25 stopnja senescence močno naraste - na 76,01%. Opazimo tudi, da je pri liniji celic MSC3 delež senescentnih celic večji kot pri liniji MSC4. Pri celični liniji MSC4 smo že na začetku, pri pasaži 13, določili nižjo stopnjo senescence - 18,24% kot pri liniji MSC3 (33,25%). Pri pasaži 18 celična linija MSC4 vsebuje nekoliko več senescentnih celic, 24,50%. Pri končni pasaži 25 pa smo določili, da je senescentnih celic MSC4 27,14%.

Pričetek staranja celic MSC je težko napovedljiv. Vemo le, da je *in vitro* proliferacijski potencial celic MSC pred nastopom senescence odvisen od zdravstvenega stanja in starosti donorjev. Mlajši in bolj zdravi donorji so vir celic MSC z višjim *in vitro* proliferacijskim potencialom, zato je pri takšnih celicah senescenza prisotna v manjšem obsegu (Stenderup in sod., 2003). Stebderup in sod. so ugotovili, da pri celicah MSC, ki izvirajo iz mlajših donorjev, odstotek z X-gal barvanjem določenih senescentnih celic z vsako podvojitvijo populacije narašča za 0,4%. Pri celicah MSC izoliranih iz starejših donorjev je z vsako podvojitvijo populacije senescentnih celic več za 4% (Stenderup in sod., 2003). V našem poskusu pri primerjavi stopnje senescence med pasažama 13 in 25 vidimo, da se je v tem območju pri celicah MSC3 senescenza poveča za 42,76%, pri celicah MSC4 pa za 8,89%. Kot vzrok različno določene stopnje senescence med linijama MSC3 in MSC4, tako kot pri določanju proliferacijske kapacitete celic MSC, lahko navedemo variabilnost samih celic MSC in razmere v mikrookolju, iz katerega so celice izolirane ter postopek njihove izolacije (Gang in sod., 2004). Pomembni dejavniki, ki spodbujajo staranje celic so oksidativne poškodbe in raven ROS, p21, p53 (Stolzing in sod., 2008). Glede na to, da so celice MSC3 izolirane iz 11 let mlajšega donorja, bi pričakovali, da je stopnja senescence celic MSC3 nižja od stopnje senescence celic MSC4.

Za celice MSC izolirane iz kostnega mozga je značilno, da v primerjavi s celicami MSC drugih virov (npr. iz popkovnične krvi in maščobnega tkiva) postanejo senescentne že pri nižjih pasažah. Tako so Kern in sod. opazili, da kar 23,6% vzorcev celic MSC iz kostnega mozga (skupno število vzorcev= 21) pri pasaži 2 kaže znake zgodnje senescence. Pri celicah MSC izoliranih iz maščobnega tkiva je odstotek senescentnih celic pri pasaži 2 bil le 5,6% (skupno število vzorcev= 18). Pri tem so senescenco opredelili na podlagi morfoloških sprememb (Kern in sod., 2006). Pri nas smo z določanjem senescence pričeli pozneje, pri pasaži 13. Na tej stopnji je senescenza pri celicah MSC3 znašala 33,25% pri celicah MSC4 pa 18,24%.

Dobljeni rezultati so v skladu s postavljenou hipotezo – da senescenza nastopi pri starejših kulturah celic MSC – vendar žal niso signifikantni. Vzrokov, da naši rezultati niso najboljši, je lahko več. Najprej je število vzorcev celic iste pasaže, ki smo jim določali stopnjo senescence premajhno za primerjavo z drugimi raziskavami. Na % celic, ki se z X-galom modro obarvajo bi lahko vplivala tudi razporeditev celic v posodici, kjer smo jih gojili do 50% konfluence. Pri neenakomerni razporeditvi celic, ko je gostota celic v

določenih predelih prevsoka (najpogosteje ob robu gojilne posodice) ali premajhna (ponavadi v sredini gojilne posodice), lahko ocena senescence varira. Znano je tudi, da je senescenca mehanizem odgovora celic na stresne razmere in da neustrezna gostota celic predstavlja stresni dejavnik (Stolzing in sod., 2008). V našem poskusu prikazan % senescentnih celic MSC temelji na povprečni vrednosti % modroobarvanih celic pri štetju okrog 200 celic, prisotnih v več vidnih poljih. To verjetno ni bila najbolj ustrezna metoda dela, predvsem zaradi prej omenjene neenakomerne razporeditve celic v določenih vzorcih. Glede na to, da smo celice šteli pod svetlobnim mikroskopom tudi človeški faktor napake pri štetju celic ni izključen. Dodatno na % celic, ki jih ocenimo kot senescentne, lahko vpliva tudi čas izpostavljenosti X-gal substratu in % CO₂ v atmosferi, ki vpliva na pH vrednost medija. Encim β-galaktozidaza je pri senescentnih celicah aktivен pri nekoliko višjih pH vrednostih (pri pH=6) kot pri normalnih celicah (pri pH=4). V naših poskusih so celice MSC bile v stiku z X-gal, okrog 20 ur. V primeru krajše, 4- do 10-urne inkubacije celic modrega obarvanja nismo opazili.

Senescenca kot biokemični proces vpliva tudi na morfologijo celic (Wagner in sod., 2008). Morfološke spremembe, ki jih navajajo drugi avtorji, smo zaznali tudi v naših vzorcih. Opazili smo, da so celice postale večje in bolj okrogle, v citoplazmi pa so se pojavile številne manjše granule. Tudi celičnega drobirja je bilo pri močno senescentnih celičnih kulturah (pri pasaži 25) veliko več kot pri celičnih kulturah pasaže 13. Opažene spremembe so značilne za procesa celičnega staranja in apoptoze, ki potekata sočasno s senescenco. Pri močno senescentnih celicah lahko pride do izgube kontaktne inhibicije, takrat celice prenehajo rasti v monosloju (Wagner in sod., 2008). V naših celičnih kulturah tudi po nastopu senescence do preraščanja celic ni prišlo.

Nastop senescence omejuje terapevtsko uporabnost celic MSC. Z nizko proliferajočimi, senescentnimi celicami MSC *ex vivo* ne moremo vzgojiti zadosti celic za *in vitro* tkivno inženirstvo ali celično terapijo. Nastop senescence predstavlja oviro zlasti pri uporabi avtolognih matičnih celic za zdravljenje starejših ljudi (Shibata in sod., 2007).

5.3 DOLOČANJE DIFERENCIACIJSKEGA POTENCIALA CELIC MSC

Multipotentni diferenciacijski potencial celic MSC smo preverjali z inducirano diferenciacijo v adipocite, hondrocite in osteocite. Poskuse smo izvedli na dveh celičnih linijah MSC - MSC3 pri pasaži 7 in MSC4 pri pasaži 8. Za poskuse diferenciacije pri nekoliko višjih pasažah smo se odločili namenoma, saj nas je zanimalo, če se s staranjem celic MSC diferenciacijski potencial ohranja.

Naši poskusi so potrdili multipotentni potencial celic MSC, saj nam je pri obeh celičnih linijah, MSC3 in MSC4, uspelo doseči diferenciacijo v izbrane celične tipe (slike 18-23). Do podobnih zaključkov so prišli tudi Kern in sod., ki so v svoji raziskavi 71,4% (5 od 7) vzorcev celic MSC iz kostnega mozga diferencirali v adipocite, hondrocite in osteocite (Kern in sod., 2006).

Uspešnost adipogene diferenciacije smo določali z nastankom maščobnih vakuol (slike 18 in 19), ki smo jih detektirali s pomočjo barvila »Oil Red O«. Ugotovili smo, da fenotip

maščobih celic pri celičnih linijah MSC3 in MSC4 ni težko doseči. V vseh poskusih je po indukciji z indometacinom nastalo veliko maščobnih vakuol, ki so se združevale v skupke. O dokaj enostavni, uspešni adipogeni diferenciaciji celic MSC poročajo tudi drugi avtorji (Yeon in sod., 2006; Kern in sod., 2006).

Hondrogeno celic MSC smo inducirali z dodatkom TGF β 3 in askorbinske kisline v gojitveni medij. Nastale mukopolisaharide in glikozaminoglikane smo nato detektirali z metodo barvanja z *Alician Blue*. Iz slik 20 in 21 je razvidno, da so se tretirane celice in celice kontrole morfološko razlikovale. Pri celični liniji MSC3 smo opazili več morfoloških sprememb kot pri MSC4, zato tudi sklepamo, da je pri celični liniji MSC3 diferenciacija v hondrocyte potekla v večjem obsegu.

Pri osteogeni diferenciaciji celic MSC smo uporabili medij, ki je vseboval deksametazon, askorbinsko kislino in glicerolfosfat. Kalcijeve depozite, značilne elemente kostnega tkiva, smo detektirali z barvanjem po Von Kossa. Iz slik 22 in 23 je razvidno, da so se tretirane celice zmanjšale in postale bolj okrogle. V vseh testnih vzorcih smo po Von Kossa barvanju dokazali prisotnost črno obarvanih kalcijevih depozitov. Pri celični liniji MSC3 je bilo kalcijevih depozitov več kot pri celicah MSC4, kar je v skladu z ugotovitvijo, da se z višanjem števila pasaž oz. s starostjo celic MSC niža osteogeni diferencijski potencial (Mueller in Glowacki, 2001; Kern in sod., 2006). Tudi sicer naj bi bilo osteogeni fenotip celic MSC izmed treh diferenciacij (adipo-, hondro- in osteogeno) najtežje doseči (Kern in sod., 2006). Kljub temu je našo ugotovitev potrebno jemati z zadržkom. Da bi lahko iz njih izpeljali splošne zaključke, bi bilo potrebno povečati število poskusov. Dodatno so že poskusi določanja stopnje senescence pokazali, da izbrani vzorec celic MSC3 morda ni bil najbolj kvaliteten.

Na podlagi izvedenih diferencijskih poskusov lahko zaključimo, da celice MSC ohranijo multipotentni potencial do pasaže 7 in 8 ter da izmed treh induciranih diferenciacij adipogena diferenciacija poteka najlažje. Tudi v drugih raziskavah so ugotovili, da je adipogeneza v primerjavi s hondrogeno in osteogenezo preferenčna diferenciacijska pot. Kernova raziskovalna skupina je dosegla 100% adipogeno diferenciacijo (adipociti so nastali pri vseh 9 vzorcih celic) (Kern in sod., 2006). Celo pri celičnih linijah višjih pasaž, ko naj bi celice MSC počasi izgubljale multipotentni potencial, se je izkazalo, da adipogeneza lahko poteče spontano. Prav zato je adipogeni fenotip celic MSC ob dodatni indukciji z indometacinom še toliko lažje doseči (Kern in sod., 2006).

S poskusi hondogene in osteogene diferenciacije smo ugotovili, da ti dve diferencijski poti lažje potečeta pri celični liniji MSC3 kot pri liniji MSC4. Pri celicah linije MSC3 je nastalo več mukopolisaharidov, glikozaminoglikanov in kalcijevih depozitov. S tem se je ponovno pokazalo, da lastnosti vseh celic MSC niso enake. Posamezne linije celic MSC se razlikujejo predvsem v proliferacijskem in diferenciacijskem potencialu.

Vzrok za večji osteo- in hondrogeni potencial celične linije MSC3 je variabilnost celičnih virov in različno število pasaž obeh linij, MSC3 in MSC4. Celice linije MSC4 so bile za eno pasažo starejše (pasaža 8) kot celice linije MSC3 (pasaža 7), kar nakazuje, da multipotentni potencial celic MSC s staranjem celične kulture upada. Dodatno so bile

celice MSC3 izolirane iz 11 let mlajšega donorja kot celice MSC4. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Mueller in Glowacki, ki sta uspešnost osteogene diferenciacije merila z izražanjem alkalne fosfataze in nastankom kolagena tipa I. Tako sta pokazala, da je 63% vzorcev celic MSC izoliranih iz mlajših donorjev (mlajših od 50 let) pozitivnih za alkalno fosfatazo. Pri starejših celicah, izoliranih iz donorjev starosti nad 50 let je ta odstotek znatno nižji - 26% (Mueller in Glowacki, 2001). Namen poskusov, ki sta jih izvedla Yeon in sod., je bil primerjava diferencijskega potenciala celic MSC med zgodnjimi in poznejšimi pasažami. Ugotovila sta, da tako adipogena kot osteogena inducirana diferenciacija uspešno potečeta pri celicah MSC pasaže 2. Kasneje, pri pasaži 10, pa raziskovalcem osteogene diferenciacije celic MSC ni več uspelo ponoviti (Yeon in sod., 2006). Nasprotno pa raziskava Stenderup in sod. ne poroča o padcu diferencijskega potenciala celic MSC, ki bi bila posledica starosti donorja ozziroma uporabljenih pasaž celic, še zlasti ne za osteogeno diferenciacijo (Stenderup in sod., 2003).

Z uspešno izvedenimi poskusi diferenciacije celic MSC v adipocite, hondrocyte in osteocytes je naša hipoteza o multipotentnem potencialu celic MSC potrjena. Raziskave so pokazale, da je celice MSC možno *in vitro* in *in vivo* uspešno diferencirati tudi do nevronov (Mezey in sod., 2003), s čimer tradicionalno prepričanje, da so matične celice odraslih oseb sposobne le diferenciacije v celice tkiva iz katerega so izolirane, izgublja na veljavi. Pri našem delu smo dodatno opazili, da starost celic MSC in število *in vitro* pasaž opredeljuje njihov diferenciacijski potencial (predvsem osteogeni) in da nekatere poti diferenciacije celic MSC lažje (spontano) potekajo.

5.4 DOLOČANJE VPLIVA KONDICIONIRANEGA MEDIJA CELIC MSC NA BOGATENJE KULTURE CELIC GBM S POPULACIJO CELIC CD133+

Mnoge raziskave poročajo o obstoju interakcij med celicami MSC in glioblastomskimi celicami (Birnbaum in sod., 2007; Hombauer in Mingue, 2000; Maestroni in sod., 1999), zato smo se odločili, da v okviru diplomskega dela raziščemo vpliv kondicioniranega medija pridobljenega iz celic MSC na izolacijo celične populacije CD133+ v primarni kulturi glioblastoma (GBM). Predvidevali smo, da dejavniki kondicioniranega medija celic MSC (MSC-CM) zavirajo proliferacijo celic CD133+. Zato smo pričakovali, da bo pri kulturah celic GBM gojenimi v kondicioniranem mediju celic MSC % izoliranih celic CD133+ nižji kot pri kontrolnih vzorcih, kjer so celice GBM bile gojene v lastnem kondicioniranem mediju.

Rezultati kažejo (slika 24), da je bilo po magnetnem ločevanju v testnih vzorcih celic CD133+ manj (3,01% pri uporabi MSC3-CM in 3,41% pri MSC4-CM) kot v kontrolnih vzorcih (6,24%). Zaradi precejšnje variabilnosti števila izoliranih celic med posameznimi poskusi (slika 27) smo določene % celic CD133+ testnih vzorcev normalizirali glede na % celic CD133+ v kontrolnem vzorcu. Tako smo ugotovili, da je opaženo zmanjšanje deleža celic CD133+ po tretiranju z obema MSC-CM, MSC3-CM ($p<0,01$) in MSC4-CM ($p<0,05$) signifikantno. S tem smo potrdili predhodno postavljeno hipotezo, da dejavniki medija MSC-CM zavirajo proliferacijo celic CD133+ ali pa izražanje označevalca CD133.

Dejavnikov kondicijskega medija celic MSC, ki so v naših poskusih zavirali proliferacijo celic CD133+ v primarni kulturi glioblastomskih celic, nismo identificirali. Vendar pa predpostavljam, da so se v MSC-CM nahajali dejavniki, ki jih omenjajo drugi avtorji. Iz predhodnih raziskav vemo, da celice MSC kontinuirano proizvajajo niz citokinov, s katerimi narekujejo proliferacijo in diferenciacijo različnih celic in mediatorjev imunskega odgovora (El Badri in sod., 2004). Kang in sod. so ugotovili, da se gostota celic GBM ob izpostavivi celicam MSC iz kostnega mozga miši zmanjša. Citotoksične učinke celic MSC so pripisali izločanju perforina in FasL, ki sta del apoptotske signalne poti ter γ -INF, ki stimulira imunske efektorske celice. Tudi izločanje nevrotrofičnih dejavnikov, predvsem živčnega rastnega dejavnika NGF, naj bi prav tako prispevalo k zaviranju rasti glioblastomskih celic (Kang in sod., 2005). Celice MSC izločajo tudi veliko dejavnikov, ki sodelujejo pri angiogenezi in hkrati zavirajo rast tumorjev. Takšen je zlasti angiopoetin-1 (Ang1) (Nakamura in sod., 2004).

Odstotek z magnetnim ločevanjem izoliranih celic CD133+ je bil precej nizek, kar je v skladu z našo domnevo, da so celice CD133+ možganske tumorske matične celice (BTSC). Celice BTSC namreč predstavljajo zelo redko celično populacijo tumorskih celic (s pogostostjo med 0,01% in 5%), ki pa imajo izjemno visok proliferacijski potencial (Rao in Mattson, 2001).

Poskus določanja vpliva MSC-CM na % izoliranih celic CD133+ v kulturi glioblastomskih celic smo ponovili trikrat in vsakokrat smo opazili zaviralni učinek MSC-CM na proliferacijo celic CD133+. Vendar smo ugotovili tudi, da je z izbrano metodo dela, magnetnim ločevanjem na MS koloni, izguba celic precejšnja (slika 27). Tako je bila npr. v prvem poskusu po magnetnem ločevanju celic GBM tretiranimi s MSC4-CM, izguba celic skoraj 90%. Na podlagi teh opazovanj sklepamo, da se je večina celic zadržala v koloni ali pa smo jih izgubili pri centrifugiranju in pipetiranju supernatanta.

Glioblastomske celice CD133+ oz. celice BTSC, so odporne na večino terapevtskih pristopov zdravljenja možganskih tumorjev. To jim omogoča povišano izražanje specifičnih skupin genov - za odpornost na zdravila, za popravljanje DNA poškodb ob kemo- ali radio-terapiji in genov za zaviranje apoptoze (Lui in sod., 2006). Glavna pomankljivost trenutno uveljavljenih terapevtskih pristopov je, da ciljajo na uničenje celotne tumorske gmote in da se ne osredotočajo na odstranitev najbolj invazivnih celic BTSC, ki so tudi začetnice tumorske tvorbe. Agresivnost celic BTSC omogoča njihova izjemno visoka proliferativna kapaciteta in invazivnost (Singh in sod., 2004a, 2004b). Celice BTSC tudi spodbujajo nastanek »mikrosatelitov«, skupkov rakavih celic, ki so oddaljeni od primarne tumorske tvorbe. Prav nedostopnost in razširjanje mikrosatelitnih celic v normalni parenhim možganov onemogoča popolno kirurško odstranitev rakavih celic (Bao in sod., 2006a). Večina bolnikov z glioblastoma multiforme tudi ob intenzivni protitumorski terapiji ima kratek čas preživetja, v povprečju le eno leto (Belda-Iniesta in sod., 2006).

Potencialno uporabnost celic MSC za zdravljenje glioblastomov predstavlja dejstvo, da celice GBM privabljajo celice MSC v svojo neposredno bližino. S celicami MSC bi bilo zato moč povzročiti tarčne, prostorsko omejene citotoksične učinke na celice BTSC (Nakamura in sod., 2004; Birnbaum in sod., 2007). Tako genetsko modificirane celice

MSC z zapisom za sintezo nekaterih interlevkinov odpirajo nove možnosti uporabe celic MSC v protirakovih terapijah. Celice MSC z vnešenim genom za IL-2 namreč zavirajo rast tumorja pri miših (Nakamura in sod., 2004). Podoben učinek dosežejo tudi celice MSC, nosilke genskega zapisa za: interferon-beta (IFN-beta), IL-4, IL-6, IL-12, TNF ali apoptotske ligande (Nakamura in sod., 2004; Nakamizo in sod., 2005; Idema in Wesseling, 2007; Birnbaum in sod, 2007).

Uporaba celic MSC v *in vivo* sistemih žal ni brez tveganj. Problem, s katerim se srečujemo je, da so normalne nevralne matične celice (NSC) fenotipsko zelo podobne celicam BTSC. Posledično obstaja možnost, da bi ob nezadostni specifičnosti delovanja celic MSC, lahko celice NSC utrpele škodo (Fan in sod., 2006). Zato bo v prihodnje pri vzpostavitvi učinkovitih sistemov zdravljenja z uporabo celic MSC potrebna še bolj natančna opredelitev razlik med celicami MSC, BTSC in NSC.

6 POVZETEK

Visok regeneracijski potencial, multipotentnost in plastičnost mezenhimskih matičnih celic so prispevali k njihovi obetavni uporabi pri *in vivo* zdravljenju številnih bolezenskih stanj in regeneraciji tkiv, med drugim tudi tumorjev glioblastoma multiforme (GBM). Le ti so zelo invazivni in zaradi nagnjenosti k tvorbi mikrosatelitov za zdravila nedostopni tumorji. Prav zaradi njihove visoke malignosti GBM trenutno uvrščamo med neozdravljiva rakava obolenja z nizkim pričakovanim preživetjem.

V diplomski nalogi smo z določanjem populacijskega podvojitenega časa celic MSC (PDT) ugotovili, da se celice MSC izolirane iz kostnega mozga različnih donorjev razlikujejo v hitrosti proliferacije. Dokazali smo tudi, da proliferacijski potencial celic MSC s podaljšanim časom *in vitro* gojenja upada.

Senescenco, ki je posledica irreverzibilne izgube proliferativne sposobnosti celic, smo določali na dveh linijah mezenhimskih matičnih celic pri treh pasažah. Z merjenjem aktivnosti encima β -galaktozidaze, in sicer preko spremljanja njene sposobnosti za razgradnjo kromogenega substrata X-gal, smo tako ugotovili, da se stopnja senescence celic MSC dveh uporabljenih linij pri enakih pasažah razlikuje. Dokazali smo tudi, da se obseg senescence z naraščajočo pasažo gojenih celic MSC povečuje.

Dodatno smo z uspešno adipogeno, hondrogeno in osteogeno diferenciacijo celic MSC potrdili njihov multipotentni potencial. Pri tem smo opazili, da je pri naših vzorcih adipogena diferencija potekla najlažje, nasprotno pa je bilo fenotip osteogeneze težje doseči.

Nazadnje so naši poskusi pokazali, da celice MSC oziroma dejavniki, ki jih le te izločajo, kažejo protitumorski potencial, ker zavirajo proliferacijo najbolj invazivnih tumorskih celic CD133+. Prav te redke celice - domnevno možganske tumorske matične celice (celice BTSC), naj bi bile odgovorne za neodzivnost rakavih tkiv na trenutno dostopne metode zdravljenja.

Na podlagi rezultatov naših poskusov predvidevamo, da bodo celice MSC v prihodnje služile pri učinkovitem zdravljenju glioblastomov. Najprej pa bo potrebno dodatno raziskati lastnosti celic BTSC in določiti zanesljive prognostične in predikcijske faktorje za sledenje odziva na terapijo. Iz varnostnega aspekta bo hkrati potrebna bolj natančna karakterizacija celic MSC. Tudi naši poskusi so namreč pokazali, da se lastnosti celic MSC lahko precej razlikujejo glede na vir, starost donorja in pogoje ter dolžino *in vitro* gojenja. Hkrati bo potrebna vzpostavitev najprimernejšega sistema znotraj katerega bi celice MSC imele protirakovo delovanje (normalne/gensko modificirane celice MSC z geni za citokine ali posredno delovanje kot dostavní sistem za encime ali onkolitične viruse).

7 VIRI

- Al-Hajj M., Clarke M.F. 2004. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, 23: 7274-7282
- Andreeff M., Goodrich D.W., Pardee A.B. 2003. Chapter 3: Cell Proliferation and Differentiation. V: Holland-Frei Cancer Medicine 6. Kufe D.W., Pollock R.E., Weichselbaum R.R., Bast R.C., Gansler T.S., Holland J.F., Frei E. (eds.). Hamilton, BC Decker. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13866/> (15. jul. 2010)
- Armisilla-Diaz A., Elvira G., Silva A. 2009. P53 regulates the proliferation, differentiation and spontaneous transformation of mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, 315: 3599-3610
- Banfi A., Muraglia A., Dozin B., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Quarto R. 2000. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. *Experimental Hematology*, 28: 707-715
- Bao S., Wu Q., Li Z., Sathornsumetee S., Wang H., McLendon R.E. 2008. Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Research*, 68: 6043-6048
- Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N. 2006a. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444: 756-760
- Bao S., Wu Q., Sathornsumetee S., Hao Y., Li Z., Hjelmeland A.B., Shi Q., McLendon R. E., Bigner D.D., Rich J.N. 2006b. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Research*, 66: 7843-7848
- Beier D., Hau P., Proescholdt M., Lohmeier A., Wischhusen J., Oefner P.J., Aigner L., Brawanski A., Bogdahn U., Beier C.P. 2007. CD133+ and 133- glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Research*, 67, 9: 4010-4015
- Belda-Iniesta C., De Castro C.J., Casado S.E., Cejas G.P., Perona R., González Barón M. 2006. Molecular biology of malignant gliomas. *Clinical and Translation Oncology*, 8, 9: 653-664
- Bernard A., Boumsell L. 1984. Human leukocyte differentiation antigens. *La Presse Médicale*, 13, 38: 2311-2316

- Bernardo M.E., Zaffaroni N., Novara F., Cometa A.M., Avanzini M.A., Moretta A., Montagna D., Maccario R., Villa R., Daidone M.G., Zuffardi O., Locatelli F. 2007. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Research*, 67: 9142-9149
- Bexell D., Gunnarsson S., Tormin A., Darabi A., Gisselsson D., Roybon L., Scheding S., Bengzon J. 2009. Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas. *Molecular Therapy*, 17, 1: 183-190
- Bexell D., Scheding S., Bengzon J. 2010. Toward brain tumor gene therapy using multipotent mesenchymal stromal cell vectors. *Molecular Therapy*, 18: 1067-1075
- Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells*, 19: 180-192
- Birnbaum T., Roider J., Schankin C.J., Padovan C.S., Schochor C., Goldbrunner R., Straube A. 2007. Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *Journal of Neuro-Oncology*, 83: 241-247
- Bjerkvig R., Tysnes B.B., Aboody K.S., Najbauer J., Terzis A.J.A. 2005. The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nature Reviews Cancer*, 5: 899-904
- Calabrese C., Poppleton H., Kocak M., Hogg T.L., Fuller C., Hamner B. 2007. Aperivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, 11: 69–82
- Chang C.J., Hsu C.C., Yung M.C., Chen K.Y., Tzao C., Wu W.F. 2009. Enhanced radiosensitivity and radiation-induced apoptosis in glioma CD133-positive cells by knockdown of SirT1 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380: 236-242
- Chen Y., Shao J.Z., Xiang L.X., Dong X.J., Zhang G.R., Chen Y. 2008. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40: 815-820
- Conti A., Aguennouz M., La Torre D., Tomasello C., Cardali S., Angileri F.F. 2009. miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, 93: 325-332
- Dean M., Fojo T., Bates S. 2005. Tumor stem cells and drug resistance. *Nature Review Cancer*, 5: 275-284

- Dell'Albani P. 2008. Stem cell markers in gliomas. *Neurochemical Research*. 33, 12: 2407-2415
- Doetsch F., Petreanu L., Caille I., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. 2002. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, 36: 1021-1034
- Ehtesham M., Kabos P., Gutierrez M.A.R., Chung N.H.C., Griffith T.S., Black K.L., Yu J.S. 2002. Induction of glioblastoma apoptosis using neural stem cell-mediated delivery of tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Research*, 62: 7170-7174
- Ehtesham M., Winston J.A., Kabos P., Thompson P.C. 2006. CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness. *Oncogene*, 25, 19: 2801-2806
- El-Badri N.S., Maheshwari A., Sanberg P.R. 2004. Mesenchymal stem cells in autoimmune disease. *Stem Cells Development*, 13: 463-472
- Fan X., Matsui W., Khaki L., Stearns D., Chun J., Li Y.M., Eberhart C.G. 2006. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Research*, 66: 7445-7452
- Gage F. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science*, 287: 1433-1438
- Galli R., Binda E., Cipelletti B., Gritti A., De Vitis S., Fiocco R., Foroni C.F., Dimeco F., Vescovi A. 2004. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Research*, 64: 7011-7021
- Gang E.J., Hong S.H., Jeong J.A., Hwang S.H., Kim S.W., Yang I.H., Ahn C., Han H., Kim H. 2004. In vitro mesogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321:102-108
- Garcia S., Bernad A., Martín M.C., Cigudosa J.C., Garcia-Castro J., de la Fuente R. 2010. Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, 15, 316, 9: 1648-1650
- Gatza C., Bandyopadhyay D., Donehower L.A., Medrano E.E. 2005. Analysis of Cellular Senescence in Culture In Vivo: The Senescence -Associated Beta-Galactosidase Assay. V: Current Protocols in Cell Biology 18.9.1-18.9.9. Houston, John Wiley & Sons. <http://dx.doi.org/10.1002/0471143030.cb1809s27> (10. jul. 2008)

Ghods A.J., Irvin D., Liu G., Yuan X., Abdulkadi I.R., Tunici P., Konda B., Wachsmann-Hogiu S., Black K.L., Yu J.S. 2007. Spheres isolated from 9L gliosarcoma rat cell line possess chemoresistant and aggressive cancer stem-like cells. *Stem Cells*, 25: 1645-1653

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

Heddleston J.M., Li Z., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N. 2009. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stemcell phenotype. *Cell Cycle*, 8: 3274-3284

Hemmati H.D., Nakano I., Lazareff J.A., Masterman-Smith M., Geschwind D.H., Bronner-Fraser M., Kornblum H.I. 2003. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 15178-15183

Hombauer H., Minguell J.J. 2000. Selective interactions between epithelial tumour cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *British Journal of Cancer*, 82, 7: 1290-1296

Honeth G., Staflin K., Kalliomäki S., Lindvall M., Kjellman C. 2006. Chemokine-directed migration of tumor-inhibitory neural progenitor cells towards an intracranially growing glioma. *Experimental Cell Research*, 312: 1265-1276

Idema A.J., Wesseling P. 2007. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathologica*, 114: 443-458

Iwamoto S., Mihara K., Downing J.R., Pui C.H., Campana D. 2007. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 4: 1049-1057

Izadpanah R., Kaushal D., Kriedt C., Tsien F., Patel P., Dufour J., Bunnell B. 2008. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Research*, 68: 4229-4238

Jackson E.L., Garcia-Verdugo J.M., Gil-Perotin S., Roy M., Quinones-Hinojosa A., VandenBerg S., Alvarez-Buylla A. 2006. PDGFR alpha positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron*, 51: 187-199

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

- Jensen R.L. 2009. Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *Journal of Neuro-Oncology*, 92: 317-335
- Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R. 2002. Pluripotency of mes-enchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49
- Jin F., Zhao L., Zhjao H.Y., Guo S.G., Feng J., Jiang X.B., Zhang S.L., Wei Y.J., Fu R., Zhap J.S. 2008. Comparison between cells and cancer stem-like cells isolated from glioblastoma and astrocytoma on expression of anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes. *Neuroscience*, 154: 541-550
- Kallis Y.N., Alison M.R., Forbes S.J. 2007. Bone marrow stemcells and liver disease. *Gut*, 56: 716-724
- Kang S.G., Jeun S.S., Lim J.Y., Yoo D.S., Huh P.W., Cho K.S., Kim D.S., Shin H.J., Kim J.H., Kim M.C., Kang J.K. 2005. Cytotoxicity of rat marrow stromal cells against malignant glioma cells. *Child's Nervous System*, 21: 528-538
- Kania G., Corbeil D., Fuchs J., Tarasov K.V., Blyszzuk P., Huttner W.B., Boheler K.R., Wobus A.M. 2005. Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem cells*, 23, 6: 791-804
- Karnoub A., Dash A.B., Vo A.P., Sulivan A., Brooks M.W., Bell G.W., Richardson A.L., Polyak K., Tubo R., Weinberg R.A. 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 9, 449: 557-563
- Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H., Bieback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*, 24: 1294-1301
- Kleihues P., Louis D.N., Scheithauer B.W., Rorke L.B., Reifenberger G., Burger P.C., Cavenee W.K. 2002. The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61: 215-225
- Kroeger K.M., Muhammad A.K.M., Baker G.J., Assi H., Wibowo M.K., Xiong W., Yagiz K., Candolfi M., Lowenstein P.R., Castro M.G. 2010. Gene Therapy and Virotherapy: Novel Therapeutic Approaches for Brain Tumors. *Discovery Medicine*, 10, 53: 293-304
- Li Z., Bao S., Wu Q., Wang H., Eyler C., Sathornsumetee S. 2009. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*, 15: 501-513

- Lim J.Y., Jeun S.S., Lee K.J., Oh J.H., Kim S.M., Park S.I., Jeong C.H., Kang S.G. 2006. Multiple stem cell traits of expanded rat bone marrow stromal cells. *Experimental Neurology*, 199: 416-426
- Liu G., Yuan X., Zeng Z., Tunici P., Ng H., Abdulkadir I.R., Lu L., Irvin D., Black K.L., Yu J.S. 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular Cancer*, 5: 67, doi:10.1186/1476-4598-5-67 <http://www.molecular-cancer.com/content/5/1/67> (2. avg. 2010)
- Locatelli F., Maccario R., Frassoni F. 2007. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to practical actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders? *Haematologica*, 92,7: 872-877
- Lu-Lu L., Liu Y., Yang S., Zhao Q., Wang X., Gong W., Han Z., Xu Z., Liu D., Chen Z., Han Z. 2006. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Hematology Journal*, 91, 8: 1017-1026
- Maestroni G.J.M., Hertens E., Galli P. 1999. Factor(s) from nonmacrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55: 663-667
- Marx J. 2003. Mutant stem cells may seed cancer. *Science*, 301: 1308-1310
- Meng X., Ichim T.E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K.W., Thebaud B., Riordan N.H. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine*, 5: 57
- Mezey E., Key S., Vogelsang G., Szalayova I., Lange G.D., Crain B. 2003. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 1364-1369
- Moore K.A., Lemischka I.R. 2006. Stem cells and their niches. *Science*, 311: 1880-1885
- Motaln H., Schichor C., Lah T.T. 2010. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer*, 116, 11: 2519-2530
- Mueller S.M., Glowacki J. 2001. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Journal of Cellular Biochemistry*, 82: 583-590
- Nakamizo A., Marini F., Amano T., Khan A., Studeny M., Gumin J., Chen J., Hentschel S., Vecil G., Dembinski J., Andreeff M., Lang F.F. 2005. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Research*, 65, 8: 3307-3318

- Nakamura K., Ito Y., Kawano Y., Kurozumi K., Kobune M., Tsuda H., Bizen A., Honmou O., Niitsu Y., Hamada H. 2004. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Therapy*, 11: 1155-1164
- Nakamura S., Yamada Y., Baba S., Kato H., Kogami H., Takao M., Matsumoto N., Ueda M. 2008. Culture medium study of human mesenchymal stem cells for practical use of tissue engineering and regenerative medicine. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 18: 129-136
- Ng F., Boucher S., Koh S., Sastry K.S.R., Chase L., Lakshmipathy U., Choong C., Yang Z., Vemuri M.C., Rao M.S., Tanavde V. 2008. PDGF, TGF- β , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood*, 112, 2: 295-307
- Nicolis S.K. 2007. Cancer stem cells and “stemness” genes in neuro-oncology. *Neurobiology of Disease*, 25: 217-229
- Nowell P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194: 23-28
- Palmer T.D., Willhoite A.R., Gage F.H. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis, *Journal of Comparative Neurology*, 425: 479-494
- Pernick N. CD Markers CD1 to CD49. 2011. PathologyOutlines.com (8. feb. 2011). <http://pathologyoutlines.com/cdmarkers.html> (10. feb. 2011)
- Pernick N. CD Markers CD100 to CD400. 2010. PathologyOutlines.com (7. apr. 2010). <http://pathologyoutlines.com/cd100247.html> (10. feb. 2011)
- Pernick N. CD Markers CD50 to CD99. 2010. PathologyOutlines.com (3. sep. 2010). <http://pathologyoutlines.com/cd5099.html> (10. feb. 2011)
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147
- Pribram H.F.W. 1966. The differentiation of extrinsic from intrinsic intracranial tumors with particular reference to posterior fossa tumors. *Differentiation of intracranial tumors*, 98, 3: 542-549
- Pumiglia K., Temple S. 2006. PEDF: bridging neurovascular interactions in the stem cell niche. *Nature Neuroscience*, 9: 299-300

- Rao M.S., Mattson M.P. 2001. Stem cells and aging: expanding the possibilities. Mechanisms of Ageing and Development, 122: 713-734
- Rebetz J., Tian D., Persson A., Widegren B., Salford L.G., Englund E., Gisselsson D., Fan X. 2008. Glial Progenitor-Like Phenotype in Low-Grade Glioma and Enhanced CD133-Expression and Neuronal Lineage Differentiation Potential in High-Grade Glioma. PLoS One, 3, 4: e1936. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0001936> (10. sept. 2010)
- Reifenberger G., Ichimura K., Reifenberger J., Elkahioun A.G., Meltzer P.S., Collins V.P. 1996. Refined Mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. Cancer Research, 56: 5141-5145
- Rendon E.M., Watt S.W. 2003. Stem cell plasticity. British Journal of Haematology, 122: 877-891
- Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature, 414: 105-111
- Rubio D., Garcia S., Paz M.F., De la Cueva T., Lopez-Fernandez L.A., Lloyd A.C., Garcia-Castro J., Bernad A. 2008. Molecular Characterization of Spontaneous Mesenchymal Stem Cell Transformation. Plos One, 3, 1: e1398. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0001398> (6. dec. 2010)
- Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M.C., Fuente R., Cigudosa J.C., Lloyd A.C., Bernad A. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation is associated with a mesenchymal-epithelial transition. Experimental Cell Research, 314: 691-698
- Sauvageot C.M., Weatherbee J.L., Kesari S., Winters S.E., Barnes J., Dellagatta J. 2009. Efficacy of the HSP90 inhibitor 17-AAG in human glioma cell lines and tumorigenic glioma stem cells. Neuro-Oncology, 11: 109-121
- Sever N. 2007. Gojenje celičnih linij. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo (interni gradivo)
- Shaifer C.A., Huang J., Lin P.C. 2010. Glioblastoma cells incorporate into tumor vasculature and contribute to vascular radioresistance. International Journal of Cancer, 127, 9: 2063-2075
- Shibata K.R., Aoyama T., Shima Y., Fukiage K., Otsuka S., Furu M., Kohno Y., Ito K., Fujibayashi S., Neo M., Nakayama T., Nakamura T., Toguchida J. 2007. Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human

mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion. *Stem Cells*, 25, 9: 2371-2382

Singh S.K., Clarke I.D., Hide T., Dirks P.B. 2004a. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, 23: 7267-7273

Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M., Bonn V.E., Hawkins C., Squire J., Dirks P.B. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*, 63: 5821-5828

Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D. 2004b. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432: 396-401

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

Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33: 919-926

Stiles C.D., Rowitch D.H. 2008. Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron*, 58, 6: 832-846

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

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

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

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

Sutter R., Yadirgi G., Marino S. 2007. Neural stem cells, tumor stem cells and brain tumors: dangerous relationships? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1776: 125-137

Terminološki slovarček. Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije. <http://www.ztm.si/res/doc/Slovarcek%20MC-3227.pdf> (5. avg. 2010)

- Tondreau T., Meuleman N., Delforge A., Dejeneffe M., Leroy R., Massy M., Mortier C., Bron D., Lagneaux L. 2005. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells*, 23: 1105-1112
- Torsvik A., Røsland G.V., Svendsen A., Molven A., Immervoll H., McCormack E., Lønning P.E., Primon M., Sobala E., Tonn J.C., Goldbrunner R., Schichor C., Mysliwietz J., Lah T.T., Motaln H., Knappskog S., Bjerkvig R. 2010. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Research*, 70, 15: 6393-6396
- Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. 2006. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *European Journal of Immunology*, 36: 2566-2573
- Vescovi A.L., Galli R., Reynolds B.A. 2006. Brain tumour stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 6: 425-436
- Wagner W., Horn P., Castoldi M., Diehlmann A., Bork S., Saffrich R., Benes V., Blake J., Pfister S., Eckstein V., Ho A.D. 2008. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *Plos One*, 3, 5: e2213. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0002213> (2. avg. 2010)
- Wang J., Sakariassen P.O., Tsinkalovsky O., Immervoll H., Bøe S.O., Svendsen A., Prestegarden L., Røsland G., Thorsen F., Stuhr L., Molven A., Bjerkvig R., Enger P.Ø. 2008. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133+ cells. *International Journal of Cancer*, 122: 761-768
- Wang J., Wakeman T.P., Lathia J.D., Hjelmeland A.B., Wang X.F., White R.R. 2009. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells*, 28: 17-28
- Warnawin E., Burakowski T., Gajewski M., Radzikowska A., Kornatka A., Michalak C., Małdyk P., Maoeliński S., Maoeliński W. 2005. Preservation of chondrogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from osteoarthritic patients during proliferation in response to platelet derived growth factor (PDGF). *Central European Journal of Immunology*, 30, 1-2: 26-31
- Weigmann A., Corbeil D., Hellwig A., Huttner W.B. 1997. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 23: 12425-12430

- Weissman I.L., Anderson D.J., Gage F. 2001. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17: 387-403
- Wodarz A., Gonzalez C. 2006. Connecting cancer to the asymmetric division of stem cells. *Cell*, 124: 1121-1123
- Wu A., Oh S., Weisner S.M., Ericson K., Chen L., Hall W.A., Champoux P.E., Low W.Q.C., Ohlfest J.R. 2008. Persistence of CD133+ cells in human and mouse glioma cell lines: detailed characterisation of GL261 glioma cells with cancer stamm cell-like properties. *Stem Cells and Developement*, 17: 173-184
- Xiao C., Yang B.F., Asadi N., Beguinot F., Hao C. 2002. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced death-inducing signaling complex and its modulation by c-FLIP and PED/PEA-15 in Glioma Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 25020-25025
- Yeon L.J., Jeun S.S., Lee K.J., Oh J.H., Kim S.M., Park S.I., Jeong C.H., Kang S.G. 2006. Multiple stem cell traits of expanded rat bone marrow stromal cells. *Experimental Neurology*, 199: 416-426
- Yu R.N., Estrada C.R. 2010. Stem cells: A review and implications for urology. *Urology*, 73, 3: 664-670
- Zhou B.B., Zhang H., Damelin M., Geles K.G., Grindley J.C., Dirks P.B. 2009. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8: 806-823
- Zipori D. 2005. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells*, 23, 6: 719-726

ZAHVALA

Mentorju, doc. dr. Miomirju Kneževiću in recezentki prof. dr. Tamari Lah Turnšek se zahvaljujem za vodenje, podporo in strokovni pregled diplomskega dela.

Posebno zahvalo namenjam delovni mentorici asist. dr. Heleni Motaln za številne nasvete, izjemno dostopnost, potrežljivost in spodbudo pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi Nacionalnemu inštitutu za biologijo, ki mi je finančno omogočil izvedbo raziskovalnega dela. Hvala zlasti Katji Kaloša za pomoč v laboratorijskem okolju.

Posebna zahvala velja dolgoletni priateljici Doris. S svojimi dejanji, predvsem z visokim pragom potrežljivosti in z nesebičnostjo mi je neštetokrat dokazala, da priateljstvo ostaja neprecenljiva vrednota. Še zlasti sem ji hvaležna za ves čas preživet tekom študijskih let, ko sva delili tako dobre kot slabe trenutke.

Največja zahvala pa gre moji mami, ker je vseskozi verjela v moje zmožnosti in mi puščala prosto pot izbire pri pomembnih odločitvah. Z brezpogojno ljubeznijo, požrtvovalnostjo in večnim optimizmom me je naučila vztrajnosti ter mi brez očitkov še vedno omogoča, da sledim svojim sanjam.