

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Eva OGOREVC

**PRIMERJAVA SPOSOBNOSTI EMBRIONALNIH IN
ODRASLIH MATIČNIH CELIC ČLOVEKA ZA
DIFERENCIACIJO V ŽIVČNE CELICE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Eva OGOREVC

**PRIMERJAVA SPOSOBNOSTI EMBRIONALNIH IN ODRASLIH
MATIČNIH CELIC ČLOVEKA ZA DIFERENCIACIJO V ŽIVČNE
CELICE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF NEUROGENIC POTENTIAL BETWEEN
EMBRYONIC AND ADULT HUMAN STEM CELLS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

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

Študijska komisija Oddelka za biologijo je na senatu dne 11.9.2009 za mentorja diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Primoža Rožmana, za recenzenta prof. dr. Borisa Buloga in za predsednico komisije prof. dr. Jasno Štrus.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

Datum zagovora:

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.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Eva OGOREVC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 576.3:611.018.1 (043.2) = 163.6
KG	Matične celice/živčevje/diferenciacija/PCR/imunofluorescentno barvanje
AV	OGOREVC, Eva
SA	ROŽMAN, Primož (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2010
IN	PRIMERJAVA SPOSOBNOSTI EMBRIONALNIH IN ODRASLIH MATIČNIH CELIC ČLOVEKA ZA DIFERENCIACIJO V ŽIVČNE CELICE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XX, 65 str., 8 pregl., 28 sl., 1 pril., 114 vir.
IJ	Sl
JI	sl/ en
AI	Matične celice so primitivne celice, ki imajo velik potencial zorenja v specializirane celice in so naravni način obnavljanja tkiv ter zato uporabne v regenerativni medicini. Namen našega dela je bil izdelati ustrezni protokol za diferenciacijo embrionalnih matičnih celic (EMC) in odraslih, mezenhimskih matičnih celic (MMC) v živčne celice ter s tem dokazati potentnost oziroma plastičnost teh celic. Uspešnost umetne diferenciacije EMC in MMC v živčne celice smo preverili na tri načine. Ves čas poskusa smo s svetlobnim mikroskopom opazovali in fotografirali morfološke spremembe celic v kulturi. Diferenciacijo smo kvalitativno ovrednotili z imunofluorescentnim barvanjem s specifičnimi označevalci. Izražanje specifičnih genov pa smo kvantitativno ovrednotili z verižno reakcijo pomnoževanja v realnem času (TaqMan® PCR). Uspešno umetno diferenciacijo EMC v živčne celice smo potrdili na vse tri načine, medtem ko je bila umetna diferenciacija MMC neuspešna. Pri slednji smo poskusili z enakim protokolom kot smo ga uporabili za umetno diferenciacijo EMC in nato še s protokolom, namenjenem diferenciaciji odraslih MC, vendar pa ne kvalitativno ne kvantitativno nismo dokazali prisotnosti živčnih celic v kulturi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 576.3:611.018.1 (043.2) = 163.6
CX Stem cells/neural differentiation/PCR/immunofluorescent staining
AU OGOREVC, Eva
AA ROŽMAN, Primož
PP SI-1000, Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
PY 2010
TI COMPARISON OF NEUROGENIC POTENTIAL BETWEEN EMBRYONIC AND ADULT STEM CELLS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XX, 65 p., 8 tab., 28 fig., 1 ann., 114 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB Stem cells are primitive cells with a large potential to mature into specialized cells. They represent a natural way of tissue regeneration and are therefore useful in regenerative medicine.
The scope of our project was to create an appropriate protocol for differentiation of embryonic stem cells (ESC) and adult mesenchymal stem cells (MSC) into nerve cells and consequently demonstrate the potency and plasticity of these cells.
The successfulness of artificial differentiation of ESC and MSC into nerve cells was assessed in three different ways. Throughout the experiment we observed and photographed morphologic changes of cells in the culture using a light microscope. Differentiation was qualitatively assessed by using immunoflourescent staining with specific markers and inverted fluorescence microscope. The expression of specific genes was quantitatively assessed using real-time polymerase chain reaction (TaqMan® PCR).
Successful artificial differentiation of ESC into nerve cells was confirmed by all three methods, whereas the artificial differentiation of MSC failed. For the latter we used an identical protocol we had used for ECS differentiation and after that we also applied a special protocol for differentiation of adult mesenchymal cells; however we were not able to either qualitatively or quantitatively demonstrate the presence of nerve cells in the culture.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
Slovarček	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI MC	3
2.2 EMBRIONALNE MATIČNE CELICE	5
2.2.1 Opis zgodnjega embrionalnega razvoja pri človeku	5
2.3 MATIČNE CELICE ODRASLIH TKIV IN ORGANOV	7
2.3.1 Mezenhimske matične celice	8
2.4 RAZLIKE MED ČLOVEŠKIMI MATIČNIMI CELICAMI ODRASLEGA IN EMBRIONALNIMI MATIČNIMI CELICAMI	9
2.5 ŽIVČEVJE	10
2.5.1 Zgradba živčevja	10
2.5.2 Razvoj živčevja	12
2.5.3 Matične celice živčevja	16
2.6 DIFERENCIACIJA MATIČNIH CELIC V ŽIVČNE CELICE <i>IN VITRO</i>	177
2.6.1 Diferenciacija embrionalnih matičnih celic v živčne celice <i>in vitro</i>	177
2.7 ZDRAVLJENJE OKVAR ŽIVČEVJA Z MC	20
3 MATERIAL IN METODE	222
3.1 DIFERENCIACIJA MC V ŽIVČNE CELICE <i>IN VITRO</i>	222
3.1.1 Material	222
3.1.2 Diferenciacija EMC v živčne celice	233
3.1.2.1 Priprava hranilnih plasti	244
3.1.2.1.1 Odmrzovanje vial s fibroblasti	244

3.1.2.1.2 Priprava medija za namnoževanje fibroblastov	244
3.1.2.1.3 Tripsinizacija	244
3.1.2.1.4 Obsevanje in nasaditev mitotsko inaktiviranih fibroblastov	255
3.1.2.2 Gojenje EMC	266
3.1.2.2.1 Priprava medija za gojenje EMC (EMC SR serum replacement medij)	26
3.1.2.2.2 Presajanje (splittinig) EMC	266
3.1.2.3 Nasaditev in priprava EMC za diferenciacijo v živčne celice	277
3.1.2.3.1 Kontrolni medij	288
3.1.2.3.2 Medija za diferenciacijo	288
3.1.3. Diferenciacija odraslih MC v živčne celice	30
3.1.3.1 Pridobivanje vzorcev kostnega mozga	30
3.1.3.2 Izolacija mononuklearnih celic iz vzorca KM	31
3.1.3.3 Gojenje celic iz KM	31
3.1.3.4 Zamrzovanje celic	32
3.1.3.5 Odmrzovanje celic	32
3.1.3.6 Diferenciacija mezenhimskih MC v živčne celice	32
3.2 KARAKTERIZACIJA DIFERENCIACIJE	344
3.2.1 Spremljanje morfologije celic z uporabo svetlobnega mikroskopa	344
3.2.2 Imunofluorescentno barvanje celic	34
3.2.2.1 Material	344
3.2.2.2 Postopek imunosfluorescentnega barvanja	35
3.2.3 Kvantitativno določanje izražanja specifičnih genov	366
3.2.3.1 Izolacija RNA	36
3.2.3.1.1 Material	36
3.2.3.1.2 Priprava na izolacijo RNA	37
3.2.3.1.3 Postopek izolacije RNA	37
3.2.3.2 Reverzna transkripcija (prepis RNA v cDNA)	38
3.2.3.2.1 Material	38
3.2.3.2.2 Postopek prepisa RNA v cDNA	39
3.2.3.3 Analiza izražanja genov z verižno reakcijo pomnoževanja v realnem času	39
3.2.3.3.1. Material	40
3.2.3.3.2 Postopek verižne reakcije pomnoževanja v realnem času	41
4 REZULTATI	42
4.1 IDENTIFIKACIJA ŽIVČNIH CELIC, DIFERENCIRANIH IN VITRO IZ EMC	42
4.1.1 Opazovanje morfologije celic	42
4.1.2 Imunofluorescentno barvanje	43
4.1.3 Kvantitativna analiza izražanja specifičnih genov	45
4.2 IDENTIFIKACIJA ŽIVČNIH CELIC, DIFERENCIRANIH IN VITRO IZ MMC	47

4.2.1 Opazovanje morfologije celic	Error! Bookmark not defined.
4.2.1.1 Opazovanje morfologije celic, diferenciranih po protokolu 1	47
4.2.1.2 Opazovanje morfologije celic, diferenciranih po Protokolu 2	48
4.2.2 Imunoflourescentno barvanje	49
4.2.3 Kvantitativna analiza izražanja specifičnih genov	49
5 RAZPRAVA	50
5.1 DIFERENCIACIJA EMC V ŽIVČNE CELICE <i>IN VITRO</i>	50
5.2 DIFERENCIACIJA MMC IZ KM V ŽIVČNE CELICE <i>IN VITRO</i>	51
5.3 PRIHODNJE DELO	52
6 POVZETEK	544
7 VIRI	56
ZAHVALA	655

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev matičnih celic glede na sposobnost diferenciacije.....	1
Preglednica 2: Somatske plasti in pripadajoča tkiva.....	3
Preglednica 3: Plastičnost matičnih celic.....	4
Preglednica 4: Razlike med hMC odraslega in hEMC.....	9
Preglednica 5: Specifični označevalci živčnih celic.....	19
Preglednica 6: Sestavine medijev za gojenje in diferenciacijo.....	29
Preglednica 7: Razmerja redčenja primarnih protiteles v PBS.....	36
Preglednica 8: Izražanje označevalcev živčnih celic pri kulturi EMC, gojeni v diferenciacijskem mediju.....	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Razvoje predimplantacijske blastociste pri ljudeh.....	6
Slika 2: Zgradba nevrona.....	11
Slika 3: Glavni derivati ektodermalne zarodne plasti.....	13
Slika 4: Nevrulacija pri vretenčarjih.....	14
Slika 5: Shematski prikaz diferenciacije EMC v kulturi.....	18
Slika 6: Aplikacije MC za zdravljenje živčnih okvar.....	21
Slika 7: Mehansko presajanje EMC.....	27
Slika 8: Shema nasaditve EMC v gojilno posodico.....	28
Slika 9: Shema nasaditve MMC v gojilno posodico.....	33
Slika 10: EMC v kontrolnem mediju, 1 dan po začetku diferenciacije.....	42
Slika 11: EMC, 14 dni po začetku diferenciacije.....	42
Slika 12: EMC, 14 dni po začetku diferenciacije.....	43
Slika 13: EMC, 22 dni po začetku diferenciacije.....	43
Slika 14: EMC, 20 dni po začetku diferenciacije v kontrolnem mediju.....	43
Slika 15: Relativno izražanje gena vimentin glede na hišni gen GAPDH.....	46
Slika 16: Relativno izražanje gena MAP-2 glede na hišni gen GAPDH.....	46
Slika 17: Relativno izražanje gena GFAP glede na hišni gen GAPDH.....	46
Slika 18: Relativno izražanje gena Musashi 1 glede na hišni gen GAPDH.....	46
Slika 19: MMC, 14 dni po začetku diferenciacije v kontrolnem mediju.....	47
Slika 20: MMC, 14 dni po začetku diferenciacije v nevromediju 1.....	47
Slika 21: MMC, 22 dni po začetku diferenciacije v nevromediju 2.....	47
Slika 22: MMC, 22 dni po začetku diferenciacije v kontrolnem mediju.....	47

Slika 23: MMC, 2 dni po začetku diferenciacije v kontrolnem mediju.....	48
Slika 24: MMC, 2 dni po začetku diferenciacije v mediju za tvorbo nevrosfer.....	48
Slika 25: MMC, 12 dni po začetku diferenciacije v kontrolnem mediju.....	48
Slika 26: MMC, 12 dni po začetku diferenciacije v kontrolnem mediju.....	48
Slika 27: MMC, 32 dni po začetku diferenciacije v kontrolnem mediju.....	49
Slika 28: MMC, 32 dni po začetku diferenciacije v nevromediju.....	49

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AP	akcijski potenital
BDNF	nevrotropni dejavnik (angl. Brain-derived neurotrophic factor)
BMP	proteini iz družine BMP (angl. bone morphogenetic protein)
CD	označevalec pripadnosti (angl. Cluster of Differentiation)
CŽS	centralni živčni sistem
DMEM/F12	Dulbeccov modificiran medij: hrnilna mešanica F-12 (angl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium: nutrient mixture F-12)
DMSO	Dimetilsulfoksid
EB	embrioidno telece (angl. Embryoid body)
EGF	epidermalni rastni dejavnik
EMC	embrionalna matična celica
FBS	fetalni goveji serum (angl. Fetal bovine serum)
FGF	rastni dejavnik fibroblastov (angl. Fibroblast growth factor)
GFAP	glijalne fibrilarne kisle beljakovine (angl. Glial fibrillary acidic protein)
h	humani (pridevnik)
ICM	notranja celična masa (angl. Inner cell mass)
IMDM	Iscove-ov Dulbeccov modificiran medij
KM	kostni mozeg
MAP-2	z mikrotubuli povezan protein 2 (angl. Microtubule-associated protein 2)
MC	matična celica
MMC	mezenhimska matična celica
MNC	mononuklerana celica

NF-200	nevrofilament 200
NGF	nevralni rastni dejavnik
PBS	fosfatni pufer (angl. Phosphate buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PSD-95	postsinaptični protein 95 (angl. Postsynaptic density protein 95)
PŽS	periferni živčni sistem
Wnt	družina proteinov Wnt
ŽMC	živčna matična celica

SLOVARČEK

Pojem	Razlaga
Adherenten (celice)	Celice, ki se pri gojenju pritrdijo na podlago oz. dno gojilne posode.
Apoptoza	Apoptoza je proces programirane celične smrti, do katerega prihaja pri večceličnih organizmih. Gre za serijo biokemičnih dogodkov, ki vodijo do morfoloških sprememb, kot so izguba membrane, skrčenja celice, fragmentacija jedra, kondenzacija kromatina in fragmentacija kromosomske DNA. Za razliko od apoptoze je nekroza celična smrt, do katere pride neprogramirano zaradi poškodbe celice. Apoptoza je v življenjskem ciklu organizma koristna, ker odstranjuje nepotrebne celice, ki jih organizem nadomesti z novimi. Vsak dan tako odmre med 50 do 70 miljard celic odraslega človeka. V enem letu je to približno enako masi celega telesa.
Asimetrična celična delitev	Celična delitev, pri kateri nastaneta dve različno diferencirani hčerinski celici, od katerih je ena enaka svoji prednici in ohranjuje njeno matičnost, to je sposobnost samoobnavljanja in vzdrževanja pluripotentnosti.
Astrocit	Razvezjana, zvezdasta celica živčevja. Astrocyti tvorijo podporno tkivo možgan in hrbitenjače (astroglia). Imajo podporno funkcijo (pomoč endotelijskim celicam pri vzdrževanju hematoencefalne bariere, prehranjevanje živčnih celic, zaraščanje in brazgotinjenje poškodb živčevja), poleg tega pa imajo tudi sposobnost prevajanja signalov in izločanja nevrottransmiterjev, podobno kot nevroni.
Avtologen	Tkivo, celice ali organ, ki jih presadimo istemu osebku, ki jih je daroval. Nanaša se lahko tudi na proteine, če jih presadimo istemu osebku, ki jih je daroval. »Avtologna uporaba« je uporaba tkiv in celic, odvetih in uporabljenih pri isti osebi.
Banka popkovnične krvi	Ustanova, ki zbira, obdeluje in shranjuje popkovnično kri za kasnejšo uporabo. Po letu 1990, ko so spoznali terapevtsko učinkovitost popkovnične krvi pri zdravljenju krvnih in imunskih bolezni s presaditvijo krvotvornih matičnih celic, so nastale številne privatne in javne banke popkovnične krvi. Javne banke financira država in shranjujejo vzorce popkovnične krvi, ki so nato na voljo vsem potencialnim bolnikom, ki jih potrebujejo. Pri tem gre za solidarnostno altruistični princip, podoben krvodajalstvu. Darovani vzorci se shranijo pod anonimno kodo, darovalci pa svojega vzorca ne morejo več uporabiti. Pri zbiranju vzorcev morajo javne banke upoštevati zelo stroge kriterije kakovosti, da so zbrani vzorci primerni za vpis v mednarodni Register. Privatne banke popkovnične krvi shranjujejo celice za darovalce same, vendar proti plačilu. To shranjevanje sloni predvsem na domnevni, da bo možno matične celice iz popkovnične krvi čez več let uporabiti za regenerativno medicino.

Blastocista	Stopnja embrionalnega razvoja zarodka tik pred koncem brazdanja, pri človeku je to 4. - 5. dan po oploditvi, sestavlja jo od 80 – 150 celic. Zunanja plast (trofoblast) obdaja s tekočino napolnjeno votlino (blastocel) in večjo skupino celic, zbranih na notranji strani (notranja celična masa ali embrioblast). Notranja celična masa je vir embrionalnih matičnih celic in se razvije v zarodek, trofoblast pa se vgnezdi v steno maternice in tvori placento. Predstopnji blastociste v razvoju zarodka sta morula in blastula, sledi pa ji gastrula.
Blastomera	Po brazdanju oplojenega jajčeca nastane v prvih dneh po prvi delitvi zigote najprej morula, ki vsebuje okrog 16 (8 – 32) blastomer, iz nje pa blastula (približno 64 – 128 blastomer). Pri človeku traja to brazdjanje okrog 3 - 4 dni. Blastomere so totipotentne celice – iz vsake lahko nastane celoten osebek, vključno z ekstraembrionalnimi in embrionalnimi tkivi. Če iz morule odstranimo eno samo blastomero (npr. za namen predimplantacijske diagnostike ploda), to razvoja morule v osebek ne moti in se ponavadi razvije v normalno blastocisto.
Blastula	Zgodnja stopnja v predimplantacijskem razvoju zarodka. Pri človeku nastane okrog 4. dne po oploditvi iz predstopnje – morule. Celice morule začnejo tvoriti votlinico, napolnjeno s tekočino (blastocel), tako da je v prerezu blastula podobna žogici. Z nadaljnimi delitvami se okrog 5. dne po oploditvi blastula sesalcev razvije v blastocisto, ki se vgnezdi v steno maternice.
Brazdanje (brazdanje zigote)	Brazdanje (tudi blastulacija) imenujemo celične delitve med razvojem zgodnjega zarodka, pred stopnjo blastociste. Pri mnogih vrstah se zigota hitro deli, količina citoplazme pa se pri tem ne povečuje – na ta način nastane skupek celic v velikosti zigote. Tako nastale celice menujemo blastomere, kompaktni večcelični zarodek pa morula. Brazdanje se zaključi, ko se razvije blastocista. Brazdanje je odvisno od količne rumenjaka v jajčni celici, zato ima pri sesalcih določene posebnosti. Prva je, da je poteka zelo počasi v primerjavi z drugimi živalskimi skupinami (nove brazde se tvorijo na 12 do 24 ur). Druga posebnost je orientacija brazd – brazdanje je rotacijsko. Prva brazda poteka meridionalno, druga brazda pa eno od blastomer razdeli meridionalno, drugo pa ekvatorialno in ta zapleteni vzorec blastulacije se nadaljuje. Tretja posebnost je asinhronost zgodnjih brazd – vse blastomere se ne delijo ob istem času, pač pa zaporedno. Četrta posebnost je proces kompakcije, pri katerem so v 8-celičnem stadiju blastomere sprva le rahlo povezane, med njimi pa so veliki intracelularni prostori. Nato se te celice sprimejo in tvorijo kompaktno morulo.
Celica prednica (sin. prekurzorska celica, ancestralna celica, materinska matična celica)	Izraz za vsako delečo se celico, ki se lahko razdeli in diferencira v vsaj dve različni hčerinski celici. V citologiji je prekurzorska celica sinonim za delno diferencirano, ponavadi unipotentno celico, ki je izgubila večino multipotentnosti matičnih celic. Sposobna je diferenciacije v eno ali dve končni obliki. V embriologiji so prekurzorske celice tista skupina celic, ki se diferencira v en organ.
Celična kultura	Gojenje prokariontskih in evkariontskih celic in vitro v umetnem gojišču v raziskovalne, diagnostične, terapevtske ali proizvodno biotehnološke namene. V praksi se izraz celična kultura nanaša na gojenje evkariontskih celic iz večceličnih organizmov, predvsem

	živalskih celic. Gojenje živalskih celičnih kultur je postalna laboratorijska praksa v sredini 20. stoletja, tehniko pa so odkrili že v 19. stoletju. Gojenje celic v celični kulturi vključuje izolacijo celic, vzdrževanje celic v kulturi pri ustreznih pogojih (37°C , 5% CO ₂) v celičnem inkubatorju in manipulacijo gojenih celic. Celice lahko gojimo v suspenzijski ali adherentni celični kulturi. Primarna celična kultura je kultura celic direktno po izolaciji. Primarne celične kulture imajo omejen življanjski čas, saj po določenem številu celičnih delitev zapadejo v senescenco in se prenehajo deliti.
Celična linija	Definirana celična populacija, ki jo daljše časovno obdobje ohranamo v kulturi <i>in vitro</i> . Po navadi pri teh celicah pride do spontane transformacije oz. dediferenciacije v bolj primitivno obliko, kar podaljša življenjsko dobo celic.
Celično zdravljenje (terapija s celicami)	Zdravljenje s presaditvijo različnih celičnih vrst. Pri tem po navadi matične celice usmerimo v razvoj v različnih končno diferenciranih celičnih tipov, ki jih potrebujemo, da z njimi popravimo okvarjene celice ali tkiva. Terapija s celicami je poleg genske terapije in tkivnega inženirstva tretja vrsta naprednega zdravljenja.
DAPI	Barvilo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) je fluorescentno barvilo, ki se močno veže na DNA. Uporabljam ga pri fluorescenčni mikroskopiji za označevanje jedra celice. Ker prehaja skozi nepoškodovano celično membrano, lahko z njim barvamo žive ali fiksirane celice. Potem, ko ga vzbudimo z ultravijolično svetlobo, oddaja modro svetlobo. Pri tem se spekter delno prekriva s spektrom fluoresceina, zelenega fluorescentnega proteina (GFP) in rdečega barvila Texas Red. DAPI označuje tudi DNA virusov in mikoplazem v celičnih kulturah. Ker vstopa v celico, je toksičen in mutagen. Podobna barvila DAPI so tudi Hoechstova barvila.
Dediferenciacija (celic)	Proces, v katerem se diferencirane somatske celice vrnejo v manj diferencirano, multipotentno stanje. Pri nižje razvitih živalih kot so črvi in dvoživke dediferenciacija sodeluje pri regenerativnih procesih. Dediferenciacija poteka tudi pri rastlinah, v kulturi se rastlinske celice namreč lahko dediferencirajo.
Diferenciacija (celic)	Proces, v katerem se manj specializirana celica razvije v bolj specializirano. Diferenciacija poteka stalno med razvojem večceličnih organizmov kot tudi v odraslem organizmu, ker se odrasle matične celice delijo in tvorijo hčerinske celice, ki se diferencirajo in skrbijo za popravljanje poškodb. Med diferenciacijo se spremeni velikost in oblika celice, membranski potencial, metabolna aktivnost in odzivnost na signale. Te spremebe so posledica spremenjenega izražanja genov. Različne celice imajo različne sposobnosti diferenciacije. Embrionalne matične celice so pluripotentne in se lahko razvijejo v katerokoli celico v organizmu. Odrasle matične celice so pri diferenciaciji že bolj omejene.
Ekspresija	Izražanje genov (oz. proteinov) je proces, v katerem se DNA prepisuje v RNA, ta pa se prevaja v beljakovine. Geni lahko mirujejo, ali pa se živahnno izražajo, posledično pa tudi prepisujejo v RNA in prevajajo v ustrezne beljakovine v celici in na njeni površini. Izražanje genov nadzira in urejuje zapleten celični aparat, sestavljen iz transkripcijskih (prevajalnih) faktorjev in številnih drugih spodbujevalcev in zaviralcev izražanja.

Ekstraembrionalna tkiva	Tkiva v maternici, ki nastanejo iz zigote, ne tvorijo pa zarodka, temveč podpirajo njegov razvoj: placenta, popkovnica in amnion.
Ektoderm	Zunanja od treh embrionalnih plasti, ki se med drugim razvije v živčni sistem in kožo. Ektoderm se razvije v povrhnjico kože (epidermis), v nohte, lase, epitelij nosu, ust in analnega kanala, očesno lečo, mrežnico, mlečno žlezo in živčni sistem.
Embrioidno telesce	Okrogel skupek celic, ki nastane iz embrionalne matične celice, če jo gojimo v suspenzijski kulturi. Embrioidna telesca vsebujejo celice vseh treh embrionalnih (zarodnih) kličnih plasti. Embrioidna telesca ne nastajajo pri normalnem razvoju, ampak se razvijejo samo v razmerah <i>in vitro</i> .
Endoderm	Notranja od treh embrionalnih plasti. Endoderm tvorijo celice, ki vzdolž pračrevesa (arhenteron) migrirajo v v notranjost zarodka. Najprej so celice splošcene, nato pa postanejo stebričaste. Endoderm se razvije v epitelij prebavne cevi (izjema so deli v ustih in požiralniku in zadnji del rektuma, ki so obdani z uvihami ektodermom), v žleze z izvodili v prebavno cev (trebušna slinavka in jetra), epitelij slušnega sistema, epitelij sapnika in pljuč, ščitnico in obščitnice ter v mehur in del sečnice.
Fibroblast	Celica vezivnega tkiva splošcene podolgovate oblike s citoplazemskimi izrastki in ovalnim jedrom. Fibroblasti sintetizirajo ekstracelularni matriks v živalskih tkivih in imajo pomembno vlogo pri celjenju ran. So najbolj pogost tip celic v živalskem vezivnem tkivu. Od epitelnih celic se razlikujejo po tem, da ne tvorijo enojnih plasti ter da niso polarizirani in pripeti na bazalno lamino. Počasi lahko tudi migrirajo skozi substrat, česar epitelne celice ne zmorjejo. Epitelne celice obdajajo votline, medtem ko fibroblasti tvorijo vezivno tkivo ogranicza.
Imunohistokemija	Biološko imunološka metoda, pri kateri uporabljam imunske kemične barvanja za proučevanje različnih tkiv in celic. V principu označimo iskani protein s protitelesom, ki se specifično veže na določen antigen, na to protitelo pa je vezan encim (npr. peroksidaza), ki lahko katalizira barvno reakcijo, s katero dokažemo prisotnost iskanega antiga. Protitelo je lahko tudi označeno s fluorescentnim barvilom (npr. fluorescein, rodamin, itd.). Metoda se uporablja pri diagnozi nenormalnih celic, npr. pri diagnostiki raka, ali v bazični znanosti za določanje raznih celičnih označevalcev in drugih proteinov.
In vitro	In vitro (latinsko: v steklu) je besedna zveza, ki se v naravoslovju nanaša na procese v epruveti oziroma v umetnem okolju (laboratoriju). Biološke procese iz narave lahko torej ponazorimo in analiziramo s poskusi in vitro. Poskusi in vitro so osnova eksperimentalne naravoslovne znanosti.
In vivo	V živem osebku oz. v naravnem okolju.
Izvorna celica (sin. primordialna celica, praizvirna celica)	Praizvirna (primordialna) celica, iz katere lahko nastanejo celice potomke. Ta termin pogosto napačno uporablja namesto pojma "matična celica" (glej tam). Izraz »praizviren« se nanaša na začetek življenja, pri celicah so mišljene najbolj primitivne, torej totipotentne celice od stopnje oplojenega jačeca do stopnje blastule (celice imenovane blastomere, do 3-4. dneva po oploditvi). Op. Izraz je zastarel in izhaja iz časa, ko niso natančno poznali

	razvoja matičnih celic in embriologije. Izvorna celica ni nujno tudi matična (nima sposobnosti asimetrične delitve in samopodvojevanja ter diferenciacije).
Klični list	Klinični list je ena od treh prvotnih embrionalnih zarodnih plasti (imenovanih tudi "somatskih plasti"), ki se začno oblikovati v blastocisti po 5. – 7. dnevu razvoja, ko se celice notranje celične mase namnožijo do števila okrog 100 in prično organizirati glede na svojo lego znotraj – zunaj, levo – desno, ter spredaj – zadaj. Poznamo tri klične liste: endoderm, ektoderm in mezoderm (glej tam).
Kostni mozeg	Mehko tkivo, ki se nahaja v dolgih kosteh. V kostnem mozgu poteka hematopoeza. Kostni mozeg vsebuje med različnimi odraslimi celicami tudi več vrst matičnih celic, npr. mezenhimske, krvotvorne in druge matične celice.
Linija (celična linija)	Vse celice ene celične vrste, ki so potomke ene skupne predniške ali matične celice.
Linijsko usmerjena celica	Celica, ki kaže vse značilnosti pripadnosti nekemu tkivu oz. določeni celični vrsti (liniji).
Matičnost	Sposobnost vzdrževanja pluripotentnosti navkljub delitvam. Matične celice vzdržujejo matičnost s pomočjo aktivnega izražanja določenih genov in z različnimi drugimi mehanizmi.
Mezenhim	Mezenhim ali mezenhimsko vezivno tkivo, je vrsta embrionalnega mehkega vezivnega tkiva, ki nastane večinoma iz mezoderma, vendar tudi iz dveh ostalih kličnih listov zarodka. Sestavlja ga osnovna medceličnina (matriks), ki vsebuje skupke fibril in nespecializiranih celic, ki se lahko razvijejo v vezivno tkivo, kost, hrustanec, limfni sistem in obtočila. Pojem je vezan na prenatalno obdobje, po rojstvu najdemo le usmerjena tkiva.
Mezenhimska matična celica (MMC)	Mezenhimske matične celice spadajo med stromalne celice kostnega mozga in imajo dvojno vlogo: a) predstavljajo izvor celic nekrvotvornih tkiv in b) so hkrati hramilne in podporne celice za rast in diferenciacijo krvnih celic in ostalih tkiv, saj sintetizirajo različne komponente zunajceličnega matriksa in različne rastne dejavnike. So multipotentne, diferencirajo se lahko v celice kosti, hrustanca, mišic in kože, verjetno pa tudi v celice drugih kličnih listov (ekto- in endoderma), kar še ni povsem raziskano. Delujejo tudi imunomodulatorno na imunske celice – zmanjšujejo imunski odziv limfocitov B in T. So zelo uporabne za zdravljenje v regenerativni medicini, pa tudi za zdravljenje avtoimunskih bolezni. Nahajajo se tudi v kostnem mozgu, ki je vir mnogih vrst matičnih celic. V njem so izvor celic nekrvotvorih tkiv, obenem pa so tudi del strome, saj tvorijo različne rastne dejavnike, potrebne za rast in diferenciacijo krvnih celic in ostalih tkiv.
Mezoderm	Klični list mezoderm je srednja od treh embrionalnih plasti, ki se razvije med gastrulacijo in leži med endodermom in ektodermom. Mezoderm se kasneje razvije v kostni mozeg (kri), vranico in druge limfne organe, srce in ožilje, skeletno muskulaturo, v vezivna tkiva, kost, hrustanec, sečila in spolovila, skorjo nadledvične žleze, ter v podkožje. Zanimivo je, da določene celice mezoderma zadržijo tudi sposobnost diferenciacije v različne smeri. Mezoderm je odgovoren za vzpostavljanje vzorcev razvoja organizma v smislu prostorske

	ureditve določenih tkiv.
Mononuklearne celice	Enojedrne celice. Skupno ime za več vrst celic krvotvornega sistema, ki jih imenujejo tudi mononuklearni levkociti in se ločijo od ostalih levkocitov (granulocitov) po tem, da ne vsebujejo granul (agranulociti) in da imajo okroglo, nesegmentirano jedro. Vključujejo limfocite, plazmatke, monocite in makrofage ter različne vrste matičnih celic.
Oligodendrocyt	Podpora celica v osrednjem živčevju, ki tvori mielinsko ovojnico. Mielinska ovojnica omogoča hitrejsje prevajanje signala po aksonih, saj signal preskakuje od zažetka do zažetka v ovojnici. Pri višjih vretenčarjih v perifernem živčnem sistemu enako funkcijo opravljajo Schwannove celice. Oligodendrocyt lahko obda okrog okoli 50 aksonov, medtem ko se Schwannova celica lahko ovije samo okoli enega aksona.
Označevalci (marker)	V celični biologiji uporabljamo ta izraz za genotipske (določeni specifični geni) ali fenotipske (določene specifične beljakovine) označevalce, ki so značilni za določen tip celic. Nahajajo se lahko na površini celice, v citoplazmi ali v celičnem jedru. Na podlagi njihovega izražanja lahko prepoznamo določeno vrsto celic pa tudi določeno patološko dogajanje v njih. Poznamo npr. označevalce pluripotentnosti, tkivno specifične označevalce, tumorske označevalce, in druge. Najbolj poznani celični označevalci so molekule CD (cluster differentiation markers).
Pasaža	Presaditev celic v celični kulturi; ponavadi presaditev opravimo, ko celice v kulturi popolnoma preraštejo dno gojitvene posode (t.i. konfluentno stanje).
Plastičnost	Sposobnost tkivnih matičnih celic (MC odraslega), da se spremenijo v celico drugega kličnega lista ali da se spremeni v odrasle celice drugega tkiva, kamor jih pred tem prenesemo. Te značilnosti pokažejo tkivne matične celice kot odgovor na fiziološke potrebe ali dražljaje. Mehanizem plastičnosti ni popolnoma pojasnjen in je sestavljen verjetno iz dediferenciacije, transdiferenciacije, transdeterminacije ter morda celo celične fuzije med odraslimi in matičnimi celicami.
Pluripotentna matična celica	Celica, sposobna tvoriti vse telesne celice, vključno z germinalnimi celicami. Primer so embrionalne matične celice. Znanstveni dokaz, da so neke celice pluripotentne, je njihova sposobnost diferenciacije v celice vseh treh embrionalnih plasti (endoderm, ektoderm in mezoderm). Označevalci pluripotentnosti so molekule TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA4, alkalna fosfataza, TERT ter transkripcijski faktorji OCT4 (POU5F1), NANOG, SOX2 in REX1. Pluripotentnost humanih embrionalnih matičnih celic vzdržuje kompleksen sistem celičnih mehanizmov, sestavljen iz zunanjih (ekstrinčnih) signalov, sistem receptorjev in specifičnih signalnih poti (Wnt, ECM, BMP, FGF, TGF, Nodal in Lif), ter skladni sistem jedrnih transkripcijskih faktorjev.
Potentnost	Sposobnost matičnih celic za diferenciacijo.
Rastni dejavnik (faktor)	Rastni dejavniki (faktorji) so molekule, ki delujejo preko specifičnih receptorjev na površini celice. Spadajo v skupino citokinov. Če se rastni dejavnik sprosti v kri, lahko deluje na oddaljene tarče (endokrini način delovanja), na sosednje celice (parakrini način

	delovanja), difundira na kratke razdalje (jukstakrini način delovanja), ali celo deluje tudi na samo celico, ki ga izloča (avtokrino delovanje). Delovanje rastnih dejavnikov je zelo pomembno pri celjenju poškodb in regeneracijo poškodovanih tkiv. Vrsta rastnih dejavnikov je udeležena pri hematopoezi. Rastni dejavniki začnejo delovati preko poti prenosa signalov, spremenijo transkripcijske faktorje, ki nato sprožijo gene, ki določijo usodo diferenciacije celic.
Regenerativna medicina	Veja medicine, ki se ukvarja z obnovo fizioloških funkcij organov in tkiv in pri tem lahko uporablja tudi <i>in vitro</i> gojene celice, metode tkivnega inženirstva, različne naravne rastne dejavnike in druge biotehnološke metode. Regenerativna medicina je odvisna od razvoja embriomike, to je poznavanja razvojnih poti vseh celic v organizmu, ter od tehnoloških rešitev biotehnologije. Razvila se je tudi na podlagi spoznanj o kloniranju sesalcev. Za razliko od drugih vrst zdravljenja, ki ponavadi ne odstranijo vzroka bolezni (zdravljenje z farmacevtskimi preparati in kirurgija), naj bi regenerativna medicina v prihodnje posegla v kavzalno zdravljenje bolnikov. Op.: Presajanje tkiv in organov, ki niso bili vzojeni za specifično uporabo terapije, ne sodi v področje regenerativne medicine.
Samoobnavljanje (samopomnoževanje)	Posebna sposobnost matične celice, da s celično delitvijo nastane vsaj ena hčerinska celica, ki je popolnoma enaka materinski in ima enako latentno sposobnost diferenciacije. Vzdrževanje matičnosti je rezultat sodelovanja številnih mehanizmov in izraženosti t.i. pluripotentnih genov. Celična delitev je po navadi asimetrična in zato se druga potomka lahko usmeri v določeno smer razvoja.
Signalna pot	Signalna pot je kaskada dogodkov, ki omogoči, da določen signal iz okolice sproži določene znotrajcelične učinke, kot so npr. aktivacija genov, spremembe metabolizma, proliferacija ali smrt celice, spodbujanje ali zaviranje njenega gibanja, in druge učinke. Kot posledica aktivirane signalne poti se lahko začnejo izražati številni geni, kar sproži številne sekundarne učinke. Klasičen primer je npr. povečana izraba glukoze iz krvi, ki jo sproži hormon inzulin, ali migracija nevtrofilcev na mesto okužbe, ki jo sprožijo razni izločki bakterij. Sodelajoče gene in zaporedje vseh dogodkov v signalni poti ponavadi imenujejo tudi "genetski program". Tipične signalne poti so npr. signalne poti BMP, FGF, TGF, Wnt in druge. Signale sprožijo različni ligandi (signalne molekule), ki se vežejo na receptorje na površini celic. Vezava liganda na receptor sproži kaskado aktivacije encimov, ki delujejo kot sekundarni prenašalci signalov do končnega biološkega učinka v celici. Večina sesalskih celic potrebuje stalno draženje z ligandi, sicer nastopi celična smrt. Zaradi motenj v prenosu signalov lahko pride do številnih bolezni.
Somatska linija (somatska plast)	Telesne celice, ki pripadajo (istemu) tkivu ali organu.
Stromalne celice kostnega mozga	Mešana populacija določenih matičnih celic (mezenhimske matične celice) in drugih nekrvotvornih celic v kostnem mozgu. Stromalne celice tvorijo nišo matičnih celic v kostnem mozgu ter podpirajo rast in razvoj krvotvornih matičnih celic in krvnih celic prednic.
Totipotentna matična	Celica, sposobna tvoriti celoten organizem vključno z

Celica	ekstraembrionalnim tkivom (trofoblast). Totipotentne celice v naravi so samo zigota in blastomere, ki nastanejo v zgodnjih celičnih delitvah zarodka do stadija morule. Po nastanku blastociste pride do prve diferenciacije celic in izgube totipotentnosti. Pri rastlinah so totipotentne meristemske celice.
Zarodna plast (sin. klična plast, klični list)	Ena od treh embrionalnih kličnih plastí, ki se začno pri človeku oblikovati v blastocisti okrog 5. – 7. dneva po oploditvi.
Živčna matična celica	Matična celica v odraslem živčnem tkivu, ki se lahko diferencira v nevrone in podporne celice glije.

Vir: Rožman in Jež, 2010

1 UVOD

Regeneracija je fiziološki proces, pri katerem se nadomestijo izgubljeni ali poškodovani telesni deli. Nekatere živali in rastline imajo izredne regenerativne lastnosti, ki človeka navdušujejo že vrsto let. Med vretenčarji so kot prvaki regeneracije znane repate dvoživke, na primer pupek in aksolotl. To je že leta 1768 prvi opisal Spallanzani (Tsonis, 2000). Odrasel pupek lahko nadomesti svoje okončine, rep, čeljusti, očesno mrežnico ter lečo in dele srca (Brockes, 2001). Regenerativne sposobnosti so zapisane v genomu živih bitij. Omogočajo jih določeni molekularni mehanizmi, ki so se razvili že pri enoceličarjih, še posebej pa pri mnogoceličarjih. Čeprav so se molekularni mehanizmi regeneracije do določene mere ohranili tudi pri sesalcih, so le-ti izgubili sposobnost popolne regeneracije udov in organov. Vendar pa jim je narava ohranila učinkovito celjenje ran in poškodb z določeno specializirano skupino celic – matičnih celic, ki jih v sebi ohranimo celo življenje in, ki omogočajo, da se tkiva in organi kljub številnim okvaram in poškodbam obnavljajo (Bongso in Richards, 2004).

Matične celice (MC, angl. stem cells) so nediferencirane celice zarodka (embrija) ali odraslega, ki imajo sposobnost dolgotrajnega deljenja (neskončno dolgo podvajanje), pri čemer gre za asimetrične delitve oziroma tvorbo sebi identičnih kopij (samoobnavljanja), ki ohranjajo lastnosti MC, in hkrati diferenciacijo v bolj usmerjene tkivne celice (Strbad in Rožman, 2005; Zipori, 2005).

Pomembna lastnost MC je tudi plastičnost – sposobnost odraslih MC, da se diferencirajo tudi v celice drugih tkiv, ne samo v celice tkiva, iz katerega izhajajo. Pri tem se celice bodisi dediferencirajo bodisi transdiferencirajo kot odgovor na spremembo okolja, na primer pri presaditvah celic v novo mikrookolje. Plastičnost pomeni, da so MC poleg samoobnavljanja, proliferacije in diferenciacije sposobne tudi pridobiti fenotip celic iz drugečnega tkiva, v določenih primerih pa celo preskočiti iz ene zarodne plasti v drugo.

Sposobnost celic za diferenciacijo v različne vrste celic oziroma potentnost z diferenciacijo upada (Strbad in Rožman, 2005).

Matične celice lahko glede na potentnost oziroma sposobnost diferenciacije razdelimo na toti-, pluri-, multi- in uni-potentne. Totipotentne celice se lahko diferencirajo v vse embrionalna in ekstraembrionalna tkiva, pluripotentne celice se lahko diferencirajo v tkiva, ki pripadajo vsem trem embrionalnim plastem, iz multipotentnih celic se lahko razvijejo celice, ki pripadajo le pripadajoči embrionalni plasti, unipotentne celice pa so tkivno specifične in se lahko razvijejo samo v eno celično linijo. Delitev je prikazana v Preglednici 1.

Preglednica 1: Razvrstitev matičnih celic glede na sposobnost diferenciacije (Rožman in sod., 2007)

Totipotentne	Sposobne so tvoriti celoten osebek in ekstraembrionalno tkivo. Lahko se diferencirajo v vse celične vrste, vključno s spermiji in jajčeci. Človeško telo sestavlja različne vrste celic (teh je več kot 200) in vse izvirajo iz ene same celice zigote oz. oplojenega jajčeca. Totipotentno je torej oplojeno jajče.
Pluripotentne	Sposobne so se diferencirati v vse tri zarodne plasti (mezoderm, ektoderm in endoderm), ne morejo pa se več razviti v trofoblast (del blastociste, ki se vgnezdi v steno maternice in se kasneje razvije v posteljico). Sem spadajo

	embrionalne matične celice.
Multipotentne (tudi oligopotentne)	Sposobne so se diferencirati v več celičnih vrst, vendar ne v vse. Take so npr. krvotvorne matične celice.
Unipotentne (predniške celice)	Sposobne so se diferencirati le v eno celično vrsto. Take so npr. predniške epitelne matične celice.

Pri odraslem človeku jih najdemo v vseh tkivih: epitelu (Slack, 2000), prebavilih (Marshman in sod., 2002), skeletnih mišicah (Asakura in sod., 2001), očeh (Coles in sod., 2004), jetrih (Herrera in sod., 2006), dojki (Böcker in sod., 2002), zobni pulpi (Miura in sod., 2003), koži (Alonso in Fuchs, 2003), lasnih mešičkih (Lavker in sod., 1993), periferni krvi (To in sod., 1997), maščobnem tkivu (Zuk in sod., 2002), testisih (De Rooij, 2003), prostatih (Hudson in sod., 2000), popkovnični krvi (McGuckin in sod., 2005) ter v ovarijih (Gosden, 2004). V teh tkivih so odgovorne za popravljanje poškodb in nadomeščanje odmrlih celic.

Embrionalne matične celice (EMC) so celice, ki izvirajo iz zgodnjega zarodka, to je pri človeku 5 do 7 dni po oploditvi (Thomson in sod., 1998) in so poleg malignih celic edine, ki se jih v *in vitro* kulturi lahko vzdržuje neomejeno dolgo. EMC se teoretično lahko razvijejo v katerokoli tkivo organizma. Imajo torej zelo visoko potentnost, so pluripotentne. Ker je izolacija humanih EMC (hEMC) iz zarodkov etično sporna, se znanost nagiba k raziskavam drugih, lažje dostopnih tipov MC, na primer mezenhimskeih MC (MMC) iz kostnega mozga (KM). MMC so multipotentne in se lahko *in vitro* diferencirajo v celice mezodermalne linije (osteoblaste, hondrocite, adipocite, mišične celice). Raziskave kažejo, da se pod določenimi eksperimentalnimi pogoji lahko diferencirajo tudi v celice drugih linij, na primer v živčne celice, torej v ektodermalno linijo, kar kaže na njihovo plastičnost (Locatelli in sod., 2007).

Izdelava funkcionalnih tkiv in organov iz MC je glavni cilj regenerativne medicine. Eno njenih temeljnih področij pa je nevrologija, ki vključuje raziskave in zdravljenje mnogih nevrodegenerativnih bolezni, na primer Parkinsonove bolezni, Alzheimerjeve bolezni, Huntingtonove bolezni, amiotrofne lateralne skleroze, multiple skleroze, poškodb hrbtnenjače in posledic kapi z metodami regenerativne medicine (Lindvall in sod., 2006).

1.1 NAMEN DELA

Namen našega dela je izdelati ustrezni protokol za diferenciacijo EMC in MMC v živčne celice ter s tem dokazati potentnost oziroma plastičnost teh celic.

1.2 HIPOTEZA

Naša delovna hipoteza je bila, da bo zaradi večje potentnosti celic diferenciacija EMC v živčne celice uspešnejša kot diferenciacija MMC.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI MC

MC so v telesu odraslega izredno redke, največ jih je v KM pa še tam le okrog 1 na 10 000 odraslih diferenciranih celic (Weissman, 2000). So nediferencirane in nespecializirane celice, po obliku podobne majhnim limfocitom. Sposobne so dolgotrajnega asimetričnega deljenja, pri čemer na eni strani nastajajo identične kopije celic (samoobnavljanje), na drugi strani pa se tvorijo nove linije bolj diferenciranih celic; iz teh nastanejo celice prednice (prekurzorji) specializiranih tkivnih celic, nato pa iz njih funkcionalne celice tkiv (Strbad in sod., 2005).

MC je možno osamiti, identificirati in jih iz njihovega naravnega okolja presaditi v novo mikrookolje. Takrat pridobijo lastnosti, ki ustrezano novemu okolju. Ta sposobnost prilagoditve je posledica pomebne lastnosti MC, ki se imenuje plastičnost. Plastičnost pomeni, da so MC poleg samoobnavljanja, proliferacije in diferenciacije sposobne pridobiti tudi fenotip celic iz drugačnega tkiva, v določenih primerih pa celo preskočiti iz ene zarodne linije v drugo (na primer iz mezoderma v ektoderm). Zarodne plasti in njim pripadajoča tkiva so navedeni v Preglednici 2.

MC lahko razširijo svojo potentnost kot odgovor na fiziološke dražljaje, pri čemer gre bodisi za dediferencijsko (razvoj odrasle ali linijsko usmerjene celice prednice v bolj primitivne oblike) ali za transdiferencijsko (sposobnost, ki omogoči diferencirani celici, da pridobi fenotipske značilnosti druge diferencirane celice). Plastičnost MC omogoča edinstvene možnosti za zdravljenje različnih bolezni oziroma uporabo teh celic v regenerativni medicini (Strbad in sod., 2005; Zipori, 2005). Uspešne in vitro diferenciacije posameznih tipov MC kot dokazi plastičnosti so navedeni v Preglednici 3.

Preglednica 2: Somatske plasti in pripadajoča tkiva (Strbad in sod., 2005)

Zarodne plasti	Pripadajoča tkiva
Endoderm	<ul style="list-style-type: none">• Priželjc• ščitnica, obščitnične žleze• požiralnik, sapnik, pluča• sečila, vagina, maternica• gastrointestinalni organi, jetra• trebušna slinavka• celice prebavil• celice dihal
Mezoderm	<ul style="list-style-type: none">• kostni mozeg, kri• skroja nadledvične žleze• limfni organi• skeletna, gladka in srčna mišična vlakna• vezivna tkiva, kosti, hrustanec• sečila in spolovila• srce in žilje
Ektoderm	<ul style="list-style-type: none">• koža• živčna tkiva (nevroektoderm)

(somatski in nevralni)	<ul style="list-style-type: none"> • sredica nadledvične žleze • hipofiza • vezivna tkiva glave in obraza • oko, notranje uho
------------------------	---

Preglednica 3: Plastičnost matičnih celic (prirejeno po Strbad in sod. 2005)

Izvor	Vrsta MC	Diferenciacija
kostni mozeg	KMC	miociti, kardiomiociti
	KMC	epitelne celice jeter, kože, pljuč, požiralnika
	KMC	Hepatociti
	KMC	skeletne mišice
	MMC	adipociti, hondrocyti, osteoblasti
	MMC	astrocyti, nevroni
	MMC	skeletno mišičje
	MMC	Miociti
	MAPC	epitelij pljuč, prebavila, astrocyti, oligodendrocyti, nevroni, krvne celice
	MAPC	Hepatociti
Možgani	žMC	rdeče in bele krvne celice
	žMC	skeletno mišičje
Jetra	KMC	vse celične linije krvi
maščobno tkivo	AMC in MMC	adipociti, hondrocyti, miociti, osteoblasti
	AMC	krvne žile
	AMC	Nevroni

Legenda: KMC – krvotvorna MC, MMC – mezenhimska MC, MAPC – multipotentna prednica odraslega, ŽMC – živčna MC, AMC – maščobna (adipozna) MC

Značilnost MC je tudi visoka telomerazna aktivnost. Telomeraza je encim, ki dodaja nukleotide na telomerne konci kromosomov, kar omogoča samoobnavljanje. Poleg tega pa imajo MC aktivne tudi številne gene, ki kodirajo popravljalne mehanizme DNA, s čimer se do neke mere preprečujejo genetske napake med številnimi podvojevalnimi cikli med samoobnavljanjem in diferenciacijo (Monitoring Stem Cell research, 2004).

Za MC je značilna visoka aktivnost še enega encima in sicer alkalne fosfataze. To je hidrolazni encim, odgovoren za defosforilacijo nukleotidov, proteinov in alkaloidov v alkalnih pogojih. Prisoten je v vseh telesnih tkivih, v večjih količinah pa ga najdemo v celicah jeter, ledvic, kosti, placente in pri zarodku. Njegova aktivnost pa se poviša tudi pri določenih bolezenskih stanjih (Thomson in sod., 1998).

MC lahko razdelimo v dve skupini: embrionalne MC, ki jih izoliramo iz zarodka (notranje celične mase blastociste) in odrasle MC, ki jih izoliramo iz različnih tkiv odraslega osebka. Nekateri avtorji pa navajajo še tretjo skupino MC in sicer fetalne MC, kamor sodijo tudi MC iz popkovnične krvi in placente (Meng in sod., 2007).

2.2 EMBRIONALNE MATIČNE CELICE

Leta 1964 so ugotovili, da je možno izolirati eno celico iz tipa raka, imenovanega teratokarcinom in, da ta preživi in raste v kulturi kot nediferencirana. Ta tip so celic so imenovali embrionalne karcinomske celice (Andrews in sod., 2005).

Leta 1981 sta M. Evans in M. Kaufman ter neodvisno od njiju tudi G.R. Martin iz mišjih zarodkov prvič izolirali embrionalne matične celice (Evans in Kaufman, 1982; Martin, 1981). Pravi preboj pa je uspel Jamesu A. Thomsonu, ki je leta 1998 razvil tehniko za izolacijo in kultivacijo humanih EMC (hEMC). Vzpostavil je prvo linijo hEMC, ki so jo pridobili pri postopku oploditve *in vitro* (IVF, angl. *in vitro* fertilization). Celice te linije so osamili iz notranje celične mase zarodka (ICM, angl. inner cell mass) v stopnji blastociste (Thomson in sod., 1998). Na tej stopnji sestavlja zarodek približno 150 – 250 celic (Rožman in sod., 2007) in zarodne plasti novega organizma še niso razvite. ICM obdajajo celice trofoblasta, ki služijo vgnezdenju zarodka v maternico in kasneje tvorijo placento in ekstraembrionalne strukture, ki povezujejo zarodek z materinim krvnim obtokom. EMC lahko po izolaciji iz blastociste gojimo v kulturi.

Linije hEMC pa lahko vzpostavimo tudi iz zarodka v stopnji morule. To je še zgodnejša stopnja razvoja zarodka, ki vsebuje le okrog 16 celic in se z nadaljnimi delitvami razvije v blastocisto (Strelchenko in sod., 2004).

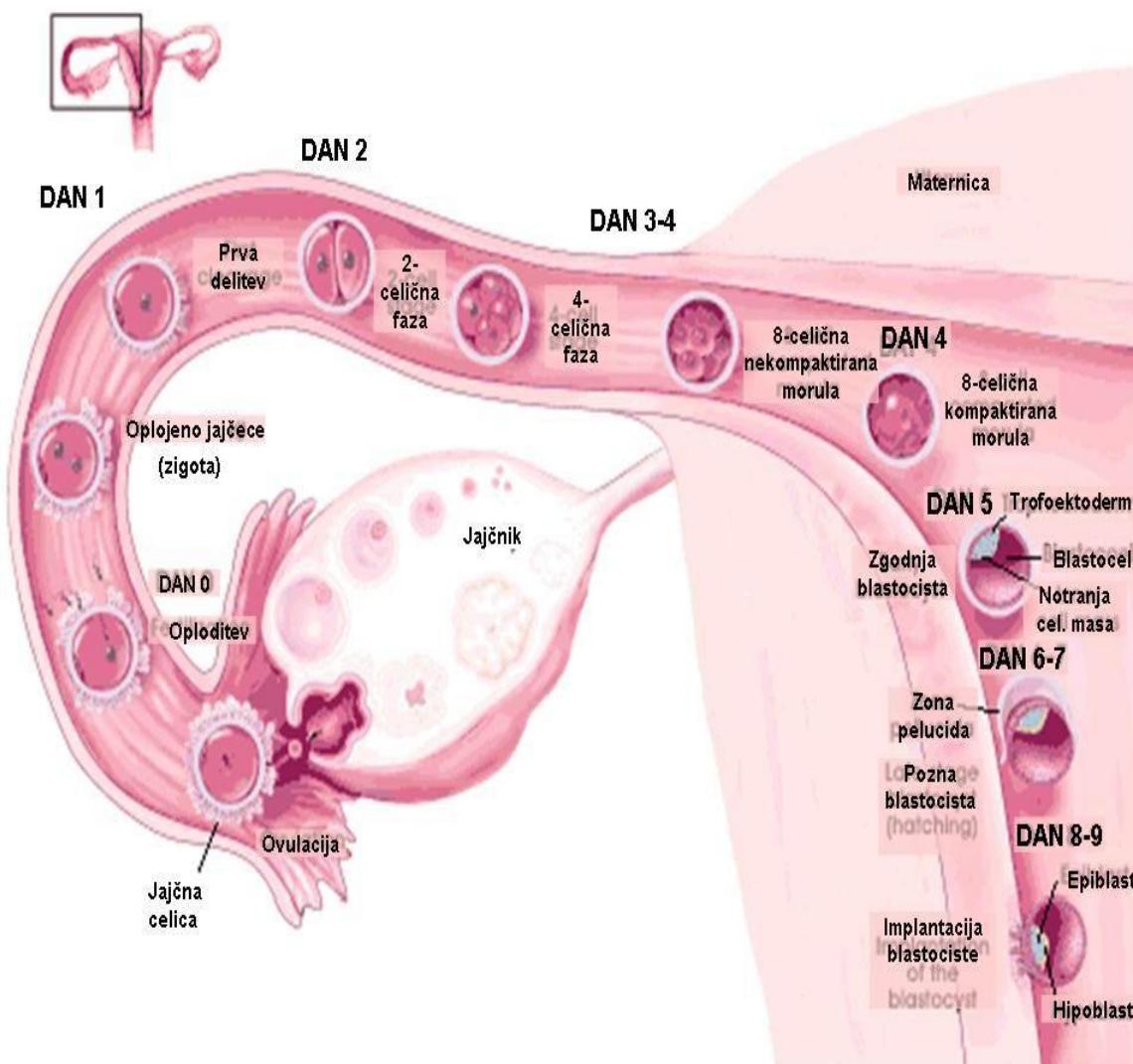
V zadnjem času pa navajajo tudi izolacijo hEMC iz posameznih izoliranih blastomer, četudi so morali te blastomere, da bi preživele, gojiti v skupkih. Blastomere so celice na razvojni stopnji zarodka, ki nastopi takoj po oploditvi jajčne celice oziraoma s prvo mitotično delitvijo zigote. Iz njih nastane morula, ki jo sestavlja 16 (8-32) celic (Klimanskaya in sod., 2006).

2.2.1 Opis zgodnjega embrionalnega razvoja pri človeku

Po oploditvi, ki se zgodi v jajcevodu, se v presledkih nekaj ur v zigoti sproži zaporedje mitotskih delitev. Tako nastajajo v prvih dneh zaporedoma tvorbe iz 2, 4, 8, 16, 32 celic in tako dalje. Rotacijsko brazdanje človeškega (sesalčjega) zarodka je specifično po tem, da ima embrijo v določenih fazah brazdanja liho število blastomer (prvi dan 2 celici, drugi dan 4 celice, sredi tretjega dne 9 celic, na koncu tretjega dne 16 celic, četrti dan 58 celic, peti dan 107 celic,...). Te delitve imenujemo brazdanje, med novonastajajočimi celicami nastajajo namreč značilne brazde. Po 4. dnevu se delitve pospešijo, skupina celic pa spominja na murvin plod, zato so ga poimenovali morula (lat. *morus* – murva). Med pomikanjem proti maternici se plod razvija naprej in na razvojni stopnji morule dospe v maternico, kjer se delitve nadaljujejo. Pri tem nastajajo številne nove celice, medtem ko se skupna prostornina ne spreminja. Masa torej ostaja enaka, močno pa se poveča skupna površina celičnih membran. Na stopnji, zgrajeni iz 64 celic, je površina 4-krat toljša kot površina zigote. To je zelo pomembno za metabolna dogajanja in informacijski pretok, ki je sorazmeren s površino celic. Celične delitve tako ob nespremenjenem volumnu omogočijo pospešeno izmenjavanje snovi in informacij.

V maternici se celične delitve nadaljujejo, morula pa se preoblikuje v mehurčkasto celično kroglico – blastocisto ali blastulo (gr. *blastos* – mehur). Njena stena je na enem mestu zadebeljena in vbočena v notranjost, to je notranja celična masa ozziroma bodoči zarodek. Na površini blastociste je plast drugačnih celic, imenovana trofoblast, ki omogoča vsaditev blastociste v maternično sluznico in postane sestavni del placente. Blastocista je v maternici 3-4 dni prosta, nato pa se pritrdi na maternično sluznico (7. dan po oploditvi ozziroma 7.-10. dan po ovulaciji). V tem času je endometrij maternice dobro pripravljen na vgnezditve blastociste, maternična sluznica je dobro razvita in prekravljena, maternične mišice pa so zaradi delovanja progesterona sproščene. Takšne razmere so nujne za uspešno vgnezditve blastociste (Perrileux in sod., 1999).

Opis zgodnjega embrionalnega razvoja pri človeku je prikazan na sliki 1.



Slika 1: Razvoj predimplantacijske blastociste pri ljudeh (Stem..., 2001: A-4)

Pridobivanje hEMC sesalcev torej poteka na več načinov, po navadi gre za postopek oploditve *in vitro*, kjer v laboratorijskem okolju združijo jajče in spermije ali pa za kloniranje (Hwang in sod., 2004). Pri kloniranju jajčni celici odstranijo jedro, spermije pa nadomesti jedro ali cela somatska celica. Z zlitjem celic nastane nova totipotentna celica, ki se lahko razvije v nov organizem. Jedro že diferencirane somatske celice lahko torej s prenosom v jajčno celico z odstranjenim lastnim jedrom programiramo na stanje, podobno embrionalnemu. Tak pristop uporabljamo pri reproduktivnem kloniranju, znan primer je ovca Dolly (Willmut in sod., 1997). Klonirane EMC, pridobljene iz blastociste, lahko gojimo in vitro, jih razmnožimo in nato uporabljamo za zdravljenje bolnika, ki je prispeval somatsko celico. Ta postopek se imenuje terapevtsko kloniranje (Jaenisch in sod., 2002). Oba postopka sta pri ljudeh prepovedana.

Postopki kloniranja (tudi terapevtskega) nedvomno odiprajo številne etične vidike in vprašanja, zato trenutno le nekatere države dovoljujejo poskuse z hEMC. V zadnjem času se je razvila tudi vrsta alternativnih metod, s katerimi lahko pridobimo hEMC, ne da bi pri tem uničili zarodek (Chung in sod., 2007).

Glavni namen pridobivanja hEMC je njihova uporaba za diferenciacijo in kasneje celično presaditev, vendar pa te celice kažejo tudi druge možne aplikacije. Ker se lahko teoretično razvijejo v katerokoli celico vseh zarodnih plasti, pri tem naletimo na številne stranske učinke, saj še nimajo razvitih genetskih nadzornih mehanizmov. To se odraža v nekontrolirani rasti celic in nastanku teratomov. Njihova klinična uporaba je zato še nedorečena, v veliki meri pa so že uporabne za različne raziskave zdravil in bolezni.

V zadnjem času so hEMC zelo natančno definirali in sicer imajo naslednje lastnosti:

- sposobnost samoobnavljanja
- sposobnost diferenciacije v vse tri zarodne plasti (ektoderm, mezoderm, endoderm)
- dokazano matičnost celic z različnimi testi, kot so: morfološke lastnosti, prisotnost površinskih antigenskih označevalcev (na primer SSEA-1, -3, -4; Tra-1-60, -80), prisotnost transkripcijskih faktorjev (na primer Oct-3 in -4), prisotnost encima alkalne fosfataze, ustrezni kariotip, prisotnost genomskeh označevalcev za vse tri zarodne plasti, telomerazna aktivnost in na koncu še tvorba teratomov *in vivo*, v imunsko oslabljeni miški (SCID miški) (Ramalho-Santos in sod., 2002).

2.3 MATIČNE CELICE ODRASLIH TKIV IN ORGANOV

Vsa tkiva odraslega človeka vsebujejo določene MC, ki so odgovorne za obnavljanje odmrlih celic in popravljanje tkivnih poškodb. Večinoma gre za unipotentne MC, v nekaterih tkivih pa najdemo tudi določen, izredno majhen delež multipotentnih MC. Tako tkivo je na primer kostni mozeg (KM). V KM se nahaja več vrst MC: mezenhimske MC, krvotvorne MC, hemanginoblasti in embrionalnim MC podobne celice. Te različne vrste MC je mogoče iz KM najprej izolirati, nato pa označiti glede na njihove označevalce in tako ločiti. Označevalci so določene celične površinske molekule, imenovane CD (angl. Cluster of Differentiation). Tako pridobljene in ločene celice lahko uporabljamo za nadaljnje raziskave (Strbad in sod., 2005).

2.3.1 Mezenhimske matične celice

Mezenhimske matične celice (MMC) sta leta 1966 prva opisala Friedenstein in Petrakova v Rusiji (Friedenstein in sod., 1966), nadalje pa jih je karakteriziral Owen v Veliki Britaniji (Owen, 1988), kjer so vzpostavili tudi sistem celičnih kultur za razmnoževanje in raziskave teh celic.

Človeške mezenhimske MC (hMMC), znane tudi pod imeni skeletne MC, stromalne celice kostnega mozga ali po novem multipotentne mezenhimske stromalne celice (Dominici in sod. 2006) so skupina klonogenih celic, prisotnih v stromi oziroma vezivnem tkivu kostnega mozga, ki so sposobne multilinijske diferenciacije v celice znotraj mezodermalne linije, na primer v osteoblaste, adipocite in hondrocite (Bianco in sod., 2001). Še vedno pa je nekoliko vprašljiva njihova sposobnost diferenciacije v celice izven mezodermalne linije, to je v ektoderm, na primer v živčne celice ali v endoderm, na primer v hepatocite (Dezawa in sod., 2004, Luk in sod., 2005).

hMMC so vretenaste, fibroblastom podobne celice, ki med rastjo *in vitro* oblikujejo kolonije (Luira in sod., 1971).

MMC imajo dvojno vlogo: predstavljajo izvorne celice za ne-krvotvorna tkiva v kostnem mozgu in so hkrati hranilne celice za podporo rasti in razvoja krvotvornih MC in krvnih celic prednic v KM, saj sintetizirajo nekatere rastne faktorje in komponente zunajceličnega matriksa. Izredno pomembne so torej za ustvarjanje niše MC kostnega mozga, saj povečujejo preživetje krvotvornih MC po presaditvi (Locatelli in sod., 2007).

Značilnost MMC je njihovo selektivno pritrjanje na plastične površine (v primerjavi s krvotvornimi MC, ki nimajo te lastnosti), kar omogoča razmeroma enostavno izolacijo od ostalih celic KM (Luria in sod., 1971, Kassem in sod., 1993, Rickard in sod., 1996). To je tradicionalna metoda za izolacijo MMC, ki pa ima tudi svoje pomanjkljivosti, na primer neizogibno kontaminacijo s krvotvornimi celicami in heterogenost celične kulture. Klonološke analize so namreč pokazale, da je v kulturi na plastiku pritrjenih hMMC iz KM, le približno 30% klonov, multipotentnih hMMC (Kuznetsov in sod., 1997). Heterogenost kulture se lahko zmanjša z nadaljnjim presajanjem celic (Jackson in sod., 2007).

Trenutno je eno temeljnih raziskovalnih področij na področju raziskav MC identifikacija primernih specifičnih označevalcev hMMC, ki bi omogočali izolacijo hMMC. Ker trenutno ne obstaja konkretni specifični označevalec, ki bi ga lahko uporabili za neposredno izolacijo, se izkorišča skupine oziroma kombinacije označevalcev, preko katerih dobimo čim bolj homogeno populacijo MMC. Vendar pa tudi tu še ni nekega splošnega konsenza o optimalni kombinaciji označevalcev MMC (Jackson in sod., 2007).

Te celice na primer ne izražajo nekaterih krvotvornih površinskih označevalcev kot so CD34, CD45 in CD14, izražajo pa druge površinske označevalce, na primer CD29, CD73, CD90, CD105, CD166 in CD44 (Foster in sod., 2005, Locatelli in sod., 2007).

Leta 1994 so razvili monoklonsko protitelo Stro-1 (Gronthos in sod., 1994), ki bi služilo izolaciji populacije MMC (Stenderup in sod., 2001). Kolf in sodelavci predlagajo uporabo

označevalca Stro-1 v kombinaciji z drugimi označevalci, na primer CD73 ali CD106 (Kolf in sod., 2007).

Mednarodno društvo za celično terapijo (angl. International Society for Cellular Therapy, ISCT) pa predlaga tri kriterije za izolacijo in karakterizacijo MMC: a) pritrjanje na plastiko b) prisotnost označevalcev CD105, CD73, CD90 in odsotnost označevalcev za monocite, makrofage in limfocite B ter CD45 in CD34 c) celice morajo biti sposobne diferenciacije vsaj v osteoblaste, adipocite in hondroblaste pod standardnimi *in vitro* pogoji (Kolf in sod., 2007)

Ker še vedno nobeden od načinov izolacije ni idealen, so kulture MMC vedno kontaminirane in ne moremo govoriti o 100% homogenosti populacije MMC, zato ne moremo zagotovo trditi, katere vrste celic se nahajajo v kulturi. Prav zato pa je vprašljiva njihova domnevna plastičnost in diferenciacijska sposobnost (Jackson in sod., 2007). Dobra stran hMMC pa je, da njihovo pridobivanje ni etično sporno (vsaj ne v toliki meri kot pridobivanje hEMC), zato predstavljajo vir za številne aplikacije v regenerativni medicini.

2.4 RAZLIKE MED ČLOVEŠKIMI MATIČNIMI CELICAMI ODRASLEGA IN EMBRIONALNIMI MATIČNIMI CELICAMI

Razlike med odraslimi MC in EMC so številne. MC odraslega so multipotentne, v zelo majhnem številu se nahajajo v organih, od koder jih je težko izolirati. Čiste celične linije odraslih MC ne obstajajo in tudi ni znano, ali se *in vitro* ohranja normalen genetski profil celic. Ker izražajo nizko stopnjo telomerazne aktivnosti, se jim s staranjem tudi krajšajo telomere, zato v kulturi dokaj hitro preidejo v senescenco in odmrejo. Po transplantaciji domnevno ne predstavljajo nevarnosti tvorbe teratomov. Pri EMC lahko za pridobivanje celic z željenim genotipom uporabimo metodo prenosa jedra, pri somatskih MC pa to ni mogoče. Zaradi svojega izvora iz tkiv odraslega človeka niso take etično sporne kot EMC in se uporablja v terapijah s transplantacijami. EMC so zaradi načina pridobivanja, ki vključuje uničenje blastociste, etično sporne. Poleg tega jih zaradi visokega tveganja tvorbe teratomov ne radi uporabljam za transplantacije. EMC so primerne za testiranje farmacevtskih substanc, za razvojne študije, za raziskave kongenitalnih bolezni, anomalij in raka ter za produkcijo gamet in embrijev. EMC so pluripotentne, izražajo visoko telomerazno aktivnost, zato se jim med delitvijo ohranja dolžina telomer. V kulturi lahko preživijo dolgo časa in pri tem ohranjajo normalen kariotip, v tkivnih bankah pa so na voljo tudi komercialne celične linije. (Preglednica 4) (Bongso in Richards, 2004).

Preglednica 4: Razlike med hMC odraslega in hEMC (prirejeno po Bongso in Richards, 2004)

hMC odraslega	hEMC
v majhnem številu se nahajajo v organih in jih je težko izolirati	ko so enkrat izolirane, kažejo visoko proliferacijo in so v izobilju
celične linije niso na voljo	celične linije na voljo, enostaven prenos celic v večji obseg
multipotentne, nizka plastičnost	pluripotentne, širša plastičnost

ohranjanje normalnega genetskega profila pri gojenju <i>in vitro</i> ni znano	ohranjanje normalnega kariotipa tudi pri visokem številu pasaž
nizka stopnja telomerazne aktivnosti	visoka stopnja telomerazne aktivnosti, neomejeno samoobnavljanje celic
s staranjem krajanje dolžine kromosomov	s pasažami ni krajanja dolžine kromosomov
senescenca in apoptoza zgodaj	pozna apoptoza
pridobivanje MC z določenim (želenim) genotipom ali pridobivanje diferenciranih tkiv ni možno	...možno z jedrnim prenosom iz somatske celice
po transplantaciji ni nevarnosti nastanka teratomov	po transplantaciji nevarnost tvorbe teratomov
težko reverzibilne epigenetske spremembe genoma	reverzibilne epigenetske spremembe genoma
pridobivanje ni etično sporno	pridobivanje etično sporno (v skladu s prevladujočo ideologijo posameznih držav oziroma ustanov)
uporaba: transplantacijske terapije	uporaba: testiranje zdravil, produkcija gamet in embrijev, raziskave ontogenetskega razvoja ter različnih bolezni in prirojenih napak

2.5 ŽIVČEVJE

2.5.1 Zgradba živčevja

Živčevje je kompleksen organski sistem, ki v telesu deluje kot kontrolni center in komunikacijsko elektrokemijsko omrežje. Ključno vlogo ima pri regulaciji homeostaze, saj organizmu omogoča, da v dinamičnem okolju deluje kot celota. Zaznava, interpretira in odgovarja na spremembe notranjega in zunanjega okolja. Jedro oziroma kontrolni center živčnega sistema predstavlja centralni živčni sistem (CŽS), sestavljen iz možganov in hrbtenače. Preko električnih signalov, ki potujejo od CŽS skozi periferni živčni sistem (PŽS), možgani nadzorujejo efektorske celice in njihove fiziološke odzive.

PŽS je sestavljen iz živcev - snopov živčnih vlaken, ki povezujejo živčne centre s čutili in z efektorji, na primer mišicami in žlezami. PŽS se deli na somatsko živčevje, ki omogoča odzivanje organizma na zunanje dražljaje in na vegetativno živčevje, ki uravnava delovanje notranjih organov in splošne življenske funkcije.

Somatsko živčevje sestavljajo možganski in hrbtenačni živci. Somatski motonevroni uravnavajo delovanje skeletnih mišic. Vse živčno-mišične sinapse tega sistema so vzpodbujevalne (ekscitacijske), nevrotransmiter v njih je acetilholin.

Vegetativno živčevje je sestavljeno iz sistema simpatika in parasimpatika. Ta del nadzira delovanje gladkega mišičja notranjih organov, srčno mišico in delovanje žlez (DeLisa in Stolov, 1982; Périlleux in sod., 1999).

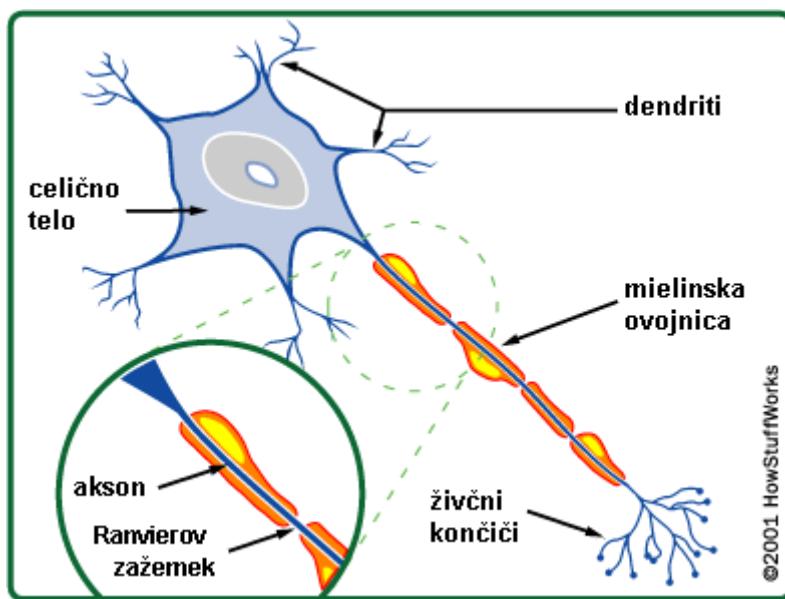
Osnovne funkcionalne ente živčnega sistema so živčne celice ozioroma nevroni, večino celic pa predstavljajo podporne celice glije, ki z ohranjanjem ustreznega ekstracelularnega okolja fizično in metabolno podpirajo nevrone. Poleg podporne vloge celice glije tudi pomembno prispevajo k razvoju živčnega sistema in tudi sodelujejo pri prenašanju informacij (Pangršič in sod., 2007). Glija celic je več vrst, ki jih delimo glede na njihove fiziološke in morfološke lastnosti v mikrogliji in makrogliji.

Mikroglija so fagociti, ki se mobilizirajo ob poškodbi, infekciji ali bolezni (Parkinsonova bolezen, Alzheimerjeva bolezen, multipla skleroza). V tej aktivirani fazi delujejo kot pomembna sestavina tako naravnega kot pridobljenega imunskega odziva.

Izvirajo iz makrofagov izven CŽS in embriološko niso sorodni nevronom in ostalim celicam glije.

Makroglija združuje tri skupine celic: oligodendrocite, Schwannove celice in astrocite. Oligodendrocite so manjše celice glije, ki v CŽS tvorijo mielinske ovojnice okoli nevronov. Schwannove celice prav tako tvorijo mielinske ovojnice, vendar v PŽS. Najštevilčnejše celice glije pa so astrocite, ki so tako kot nevroni ektodermalnega izvora. S kompleksnim sistemom receptorjev in kanalčkov nadzorujejo integriteto CŽS. Astrocite kontrolirajo razvoj in vzdrževanje sinaptičnih povezav med nevroni, regulirajo ionsko sestavo v intracelularnem prostoru, sodelujejo pri obnovi nevrotransmiterjev in modulirajo sinaptično transmisijo. Pomembno naloge imajo tudi pri odstranjevanju poškodovanih nevronov s fagocitozo. Kot del citoskeleta astrocite vsebujejo intermediarne filamente iz gljalne fibrilarne kisle beljakovine (GFAP) in zaradi visoke koncentracije teh filamentov nudijo tudi oporo nevronom in s tem določajo možgansko strukturo (Kandel in sod., 2000; Nestler in sod., 2001).

Nevroni so osnovne funkcionalne enote živčevja in so sestavljeni iz treh delov: telesa (soma) nevrona, ki vsebuje strukture (jedro, ribosomi...), potrebne za sintezo makromolekul, dendritov, ki sprejemajo signale iz okolice in jih prenašajo proti telesu nevrona ter aksona, ki prenaša signale stran od telesa nevrona. Aksoni so lahko dolgi do 1 metra in so obdani z mielinskimi ovojnicami, ki skupaj z Ranvier-jevimi zažetki omogočajo hitro in skokovito prenašanje signala (Perrileux in sod., 1999). Zgradba nevrona je prikazana na sliki 2:



Slika 2: Zgradba nevrona (prirejeno po www.howstuffworks.com)

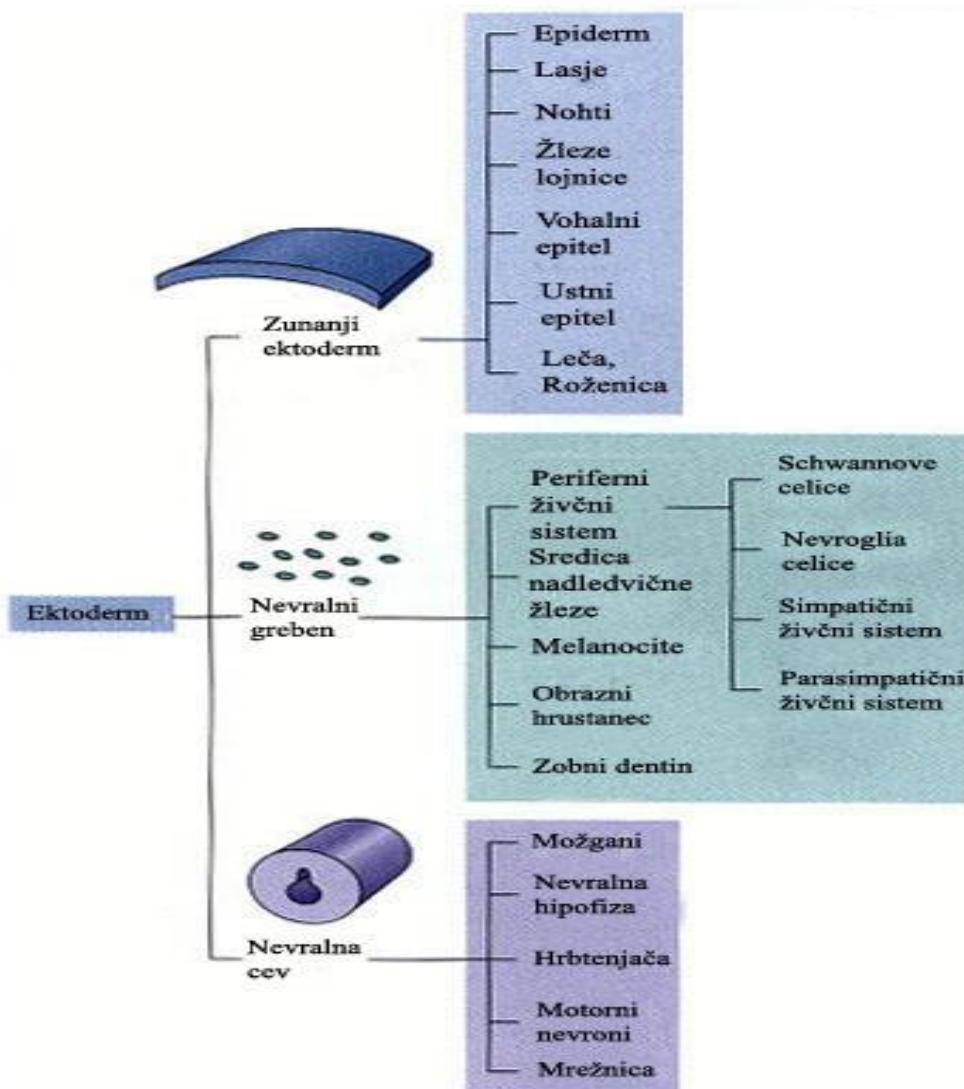
Ponavadi je vsak nevron povezan s tisočimi drugimi v posebnih stikih aksona ene celice z dendritom druge celice. Ta povezava se imenuje sinapsa. Signali, ki potujejo v možgane in iz njih oblikujejo električne impulze ozziroma akcijske potenciale (AP). V sinapsi tak impulz povzroči sproščanje nevrottransmiterja, ki signal prenese na naslednji nevron. Potovanje teh impulzov je izredno hitro in omogoča hitre telesne odzive. Na podlagi smeri potovanja AP lahko nevrone razdelimo na aferentne (prevajanje AP od periferije proti centralnemu živčevju), eferentne (prevajanje AP od centralnega živčevja proti periferiji) in internevrone, ki služijo za povezavo aferentnih in eferentnih med seboj.

2.5.2 Razvoj živčevja

Že Gregor Eichele se je leta 1992 spraševal, ali so možgani dovolj mogočni, da bi rešili problem svojega lastnega nastanka. In resnično je struktura in delovanje organa, ki zaznava, razmišlja, ljubi, sovraži, se spominja, se spreminja in uravnava našo zavest in podzavest nedvomno ena največjih ugank razvojne biologije (Gilbert, 2003).

Zaradi etičnih zadržkov in tehničnih omejitev v raziskavah zgodnje nevrogeneze pri človeku, večina našega znanja izhaja iz raziskav modelnih organizmov: žabe, ribe zebrice, kokoši, miši (Rivolta in Trachoo, 2009).

V zgodnjem embrionalnem razvoju, med procesom gastrulacije, se dogajajo številne celične migracije, ki v embriju oblikujejo tri zarodne plasti: ektoderm, mezoderm in endoderm. Zarodek se v tej fazi imenuje gastrula. Del dorzalnega ektoderma postane nevralni ektoderm, razpoznaven po stolpičasti obliki celic. Ta del zarodka se imenuje nevralna plošča. S tem se začne nova faza embrionalnega razvoja – nevrulacija, ki je že del organogeneze. Zarodek se v tej fazi imenuje nevrula (Gilbert, 2003). Razvoj vretenčarskega ektoderma je prikazan na sliki 3.

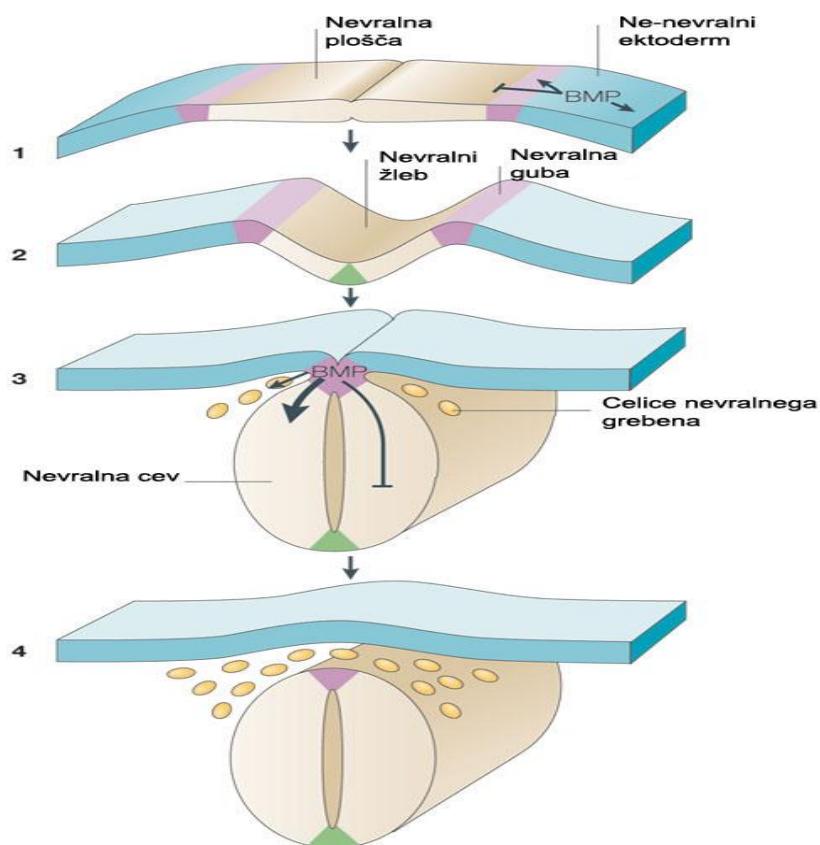


Slika 3: Glavni derivati ektodermalne zarodne plasti. Ektoderm se deli v tri glave domene: površinski ektoderm (epidermis), nevralni greben (periferni nevroni, pigment, obrazni hrustanec) in nevralno cev (možgani in hrbtenjača). (prijezeno po Gilbert, 2003).

V fazi primarne nevrulacije se originalni ektoderm deli v tri sete celic, ki gradijo nevralno ploščo:

- notranji del celic se diferencira v nevralno cev, ki bo oblikovala možgane in hrbtenjačo
- periferno od teh se del celic diferencira v nevralni greben, katerih celice se v fazi sekundarne nevrulacije ob zapiranju nevralne cevi diferencirajo v mezenhimatski tip celic, ki migrirajo po glavini in trupni regiji zarodka in prispevajo k zgradbi mnogih organov
- najbolj periferno se iz robnih delov nevralnega ektoderma diferencirajo nevrogene plakode, ki se razvijejo v dele ali celotne čutilne organe (npr vohalni organ, notranje uho, mehanoreceptorni nevromasrti pobočnice, elektroreceptorni ampularni organi) in pripadajočo primarno inervacijo.

Med vretenčarsko nevrulacijo nastajajo celice z nevrogenim potencialom, ki jih lahko imenujemo živčne matične celice (ŽMC), v treh glavnih strukturah, ki izhajajo iz ektoderma. Najprej se nevralna plošča razvije v nevralni žleb, ta vsebuje ŽMC, ki se bodo razvile v nevronske progenitorje, astrocite in oligodendrocite centralnega živčnega sistema (Temple, 2001). Z migracijo bodo celice nevralnega grebena kasneje oblikovale periferni živčni sistem, avtonomne nevrone, pigmentirane celice kože in strukture kranio-facialnega vezivnega tkiva (Dupin in sod., 2007). Ektodermalne plakode, ki potekajo na zunanjji strani nevralne plošče, lateralno ob nevralnem grebenu pa bodo oblikovale kranialne senzorične ganglije in adenohipofizo (Streit, 2007). Preostali ne-nevralni ektoderm se bo oblikoval v kožo (Jalali in sod., 2006).



Slika 4: Nevrulacija pri vretenčarjih (prirejeno po Gilbert, 2003).

Med nevrulacijo so embrionalne ektodermalne celice odgovorne za induktivne interakcije z obdajajočim mezodermom in ektodermom (Kuroda in sod., 2004, Wilson in sod., 2001). Za nevralno indukcijo je potrebna inhibicija epidermalne celične usode in promocija nevralne usode znotraj ektoderma. Proteini iz družine BMP (angl. bone morphogenetic protein) igrajo kot signalne molekule pomembno vlogo v promociji epidermalne usode (Suzuki in sod., 1997). Novo nastajajoča nevralna cev je pod vplivom dveh signalnih centrov. Streha nevralne cevi je pod vplivom BMP4 in BMP7 iz epidermisa. Dno nevralne cevi je izpostavljeno Shh proteinu iz chorde dorsalis. Sekundarni signalni centri se vspostavijo v sami nevralni cevi.

BMP4 se izraža in izloča iz celic strešne plošče, Shh pa se izraža in izloča iz celic talne plošče v razvijajoči se hrbtenjači.

BMP4 vspostavi kaskado TGF- β faktorjev, ki se širijo ventralno kot gradient iz celic stropne plošče. Shh pa se širijo dorzalno kot gradient iz celic talne plošče.

Nevroni spinalnih živcev dobijo svojo identiteto z izpostavitvijo gradientom parakrinskih faktorjev. Količina in tip parakrinskih faktorjev povzroči aktivacijo različnih transkriptorskih faktorjev v jedrih teh celic.

Proteini BMP so skupina rastnih faktorjev in citokinov, ki v organizmu urejajo nastanek in razvoj kosti in hrustanca. V poteku signalne poti proteini BMP najprej reagirajo s specifičnimi receptorji (bone morphogenetic protein receptors ali BMPRs) na površini tarčne celice, kar mobilizira proteine iz družine SMAD. Cela signalna pot vpliva na razvoj srca, osrednjega živčevja in hrustanca ter na postnatalni razvoj kosti. Člani te družine imajo pomembno vlogo v embrionalnem razvoju segmentov in razvoju skeleta. BMP4 z inhibitorjem nogginom in chordinom urejuje polarnost spredaj – zadaj (Rožman in Jež, 2010).

Pod ektodermom ležeči mezoderm ima pomembno vlogo kot regulator gradienata aktivnosti molekul BMP. S produkcijo inhibitorjev BMP (na primer noggin-a) in s tem nasprotnim delovanjem molekulam BMP, ki jih izloča ektoderm, namreč mezoderm ustvarja področja nizke, vmesne in visoke aktivnosti BMP, ki sovpadajo z nastankom nevralne plošče, nevralnega grebena in epidermisa (Marchant in sod., 1998).

V amniotskem embrionalnem razvoju je za oblikovanje nevralne plošče potreben tudi fibroblastni rastni faktor (FGF, angl.: fibroblast growth factor), ki ohranja aktivnost BMP mRNA in nevralno usodo celic. Rastni dejavniki fibroblastov (FGF) so družina rastnih faktorjev, ki preko signalne poti FGF deluje mitogeno. Odgovor na signalizacijo preko FGF ni popolnoma specifičen, temveč je odvisen od celičnega cikla, diferenciranosti celice in drugih dejavnikov. Zato lahko daje stimulacija s FGF včasih nasprotuječe si učinke. Celo signalno pot spremlja vrsta urejevalnih mehanizmov, ki jo bodisi ojačajo ali zavrejo. Končni učinek te signalne poti je tvorba žil, proliferacija endotelijskih celic, sinteza kolagena, celjenje rane, sinteza matriksa in produkcija rastnega dejavnika keratinocitov. Sodeluje tudi pri embrionalnem razvoju, oblikovanju anteriono-posteriorne osi, nastanku udov, itd. (Rožman in Jež, 2010).

FGF sam ali v kombinaciji z antagonisti BMP (na primer noggin, hordin, folistatin) je nujen, vendar nikakor zadosten dejavnik za indukcijo nevralne usode celic (Wilson in sod., 2001, Liu in sod., 2000). Za izbiro med nevralno in epidermalno usodo je nujno potrebno pozitivno in negativno signaliziranje z molekulami Wnt. Določeni proteini signalne poti Wnt urejajo razporejanje celic med gastrulacijo, ali razporejajo rast aksonov v možganih in hrbtenjači. V embrionalnih matičnih celicah delujejo proteini Wnt kot rastni faktorji, ki spodbujajo proliferacijo in diferenciacijo pluripotentnih matičnih celic v mezodermalne in endodermalne progenitorje (Rožman in Jež, 2010). Zanimivo je, da v embrioidnih telescih v celični kulti pride pod vplivom signalne poti Wnt do do gastrulacije, ki posnema normalno embriogenezo. Pri piščančjih zarodkih je bilo dokazano, da stalna izpostavljenost signalom Wnt inhibira odgovor celic na FGF, torej omogoča molekulam BMP, da usmerjajo celice v epidermalno usodo. Nasprotno pa pomanjkanje signala Wnt vodi v indukcijo nevralne usode celic s tem, da omogoča delovanje FGF (Zimmerman in sod., 1996).

Živčne celice torej postanejo specifične skozi interakcije z drugimi celicami. Obstajajo vsaj štiri stopnje, skozi katere pluripotentna celica blastule postane živčna prekurzorska celica oziroma nevroblast:

- kompetenca: celice lahko postanejo nevroblasti, če so izpostavljene pravilni kombinaciji signalov
- specifikacija: celice so prejele primerne signale, da bi postale nevroblasti, vendar živčno diferenciacijo še vedno lahko zavrejo ostali signali
- usmerjenost (determinacija): nevroblasti so vstopili v živčno diferenciacijo in bodo postali živčne celice tudi v prisotnosti inhibitornih signalov
- diferenciacija: nevroblasti zapustijo mitotski cikel in izražajo gene, značilne za živčne celice (Wilson in Edlund, 2001).

Celice z nevrogenim potencialom se torej nahajajo v nevralni plošči, nevralnem grebenu in ektodermalnih plakodah. V glavnem sta proliferacija in diferenciacija ŽMC odvisni od njihove izbire med simetričnimi in asimetričnimi celičnimi delitvami v različnih stopnjah razvoja. Simetrične delitve se dogajajo predvsem v zgodnjih fazah nevrogeneze, nastajajo enake hčerinske celice, ki predstavljajo rezervoar ŽMC (Chenn in sod., 1995, Lu in sod., 2000). V kasnejših fazah nevrogeneze pa dve hčerinski celici nastajata v procesu asimetrične delitve, ki uravnava pravilno število končno diferenciranih celic kot so nevroni ali podporne celice gleje na pravem mestu ob pravem času. Mehanizem asimetrične delitve med nevrogenezo je evolucijsko ohranjen (Temple 2001, 2006).

Različni deli živčnega sistema pa so tudi pod vplivom mnogih ligandov in signalnih molekul, ki jih izločajo specifična tkiva in organizirani centri.

2.5.3 Matične celice živčevja

Do nedavnega je prevladovalo mnenje, da ko je živčni sistem enkrat vzpostavljen, novi nevroni ne nastajajo več. Nevroni, ki so se razvili *in utero* in v prvih letih življenja naj bi bili vse, kar bomo kdaj imeli. Nove raziskave pa kažejo, da so odrasli sesalčji možgani sposobni tvorbe novih nevronov in, da lahko okoljski dražljaji povečajo število teh nevronov. Seveda se vse to dogaja v majhnem obsegu (Gilbert, 2003).

Nevrogeneza se odvija v dveh specifičnih regijah možganov in sicer v vohalnem betiču (bulbus olfactorius) in v dentatnem girusu. Poleg tega je relativno veliko živčnih prekurzorjev (multipotentne in unipotentne celice) tudi v drugih, nepovezanih delih sesalčjih možganov (Altman in Das, 1965; Gage, 2000; van der Kooy, 2000).

Nevrogeneza pri odraslem osebku predstavlja niz dogodkov, ki se začne z delitvijo živčnih prekurzorskih celic in konča s prisotnostjo in preživetjem zrelih, integriranih in funkcionalnih novih živčnih celic. Nevrogeneza torej ni zgolj proliferacija živčnih prekurzorskih celic. Karakterizacija in identiteta ŽMC še ni enotna, saj gre za izredno heterogeno populacijo celic. Vseeno pa obstaja nekaj lastnosti, ki so tem celicam skupne: ŽMC so nediferencirane, pogosto zelo mobilne, razmeroma odporne na hipoksijo in druge poškodbe, visoko proliferativne in sposobne proizvajanja zrelih nevronov in podpornih celic glije (Sohur in sod., 2006).

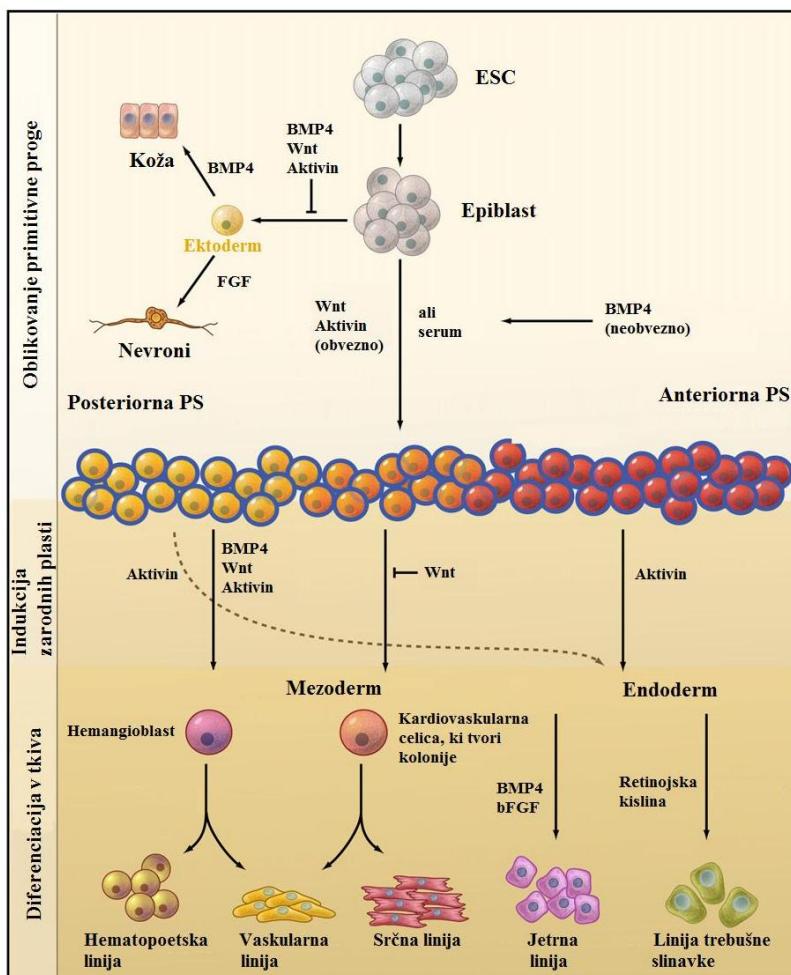
2.6 DIFERENCIACIJA MATIČNIH CELIC V ŽIVČNE CELICE *IN VITRO*

Umetna izdelava specializiranih diferenciranih živčnih celic, ki izhajajo iz MC naj bi predstavljal revolucionarno tehnologijo v regenerativni medicini. Vendar pa je bilo do zdaj na tem področju opisanih razmeroma malo uspešnih diferenciacij. Čeprav se zdi pri ne-živčnih tkivih presajanje iz MC pridobljenih nadomestkov precej enostavno, predstavlja visoka kompleksnost živčnega sistema na tem področju poseben izziv. Poznavanje raznolikosti nevronov je pomembno ne samo zaradi terapevtskih namenov, ampak tudi zaradi razumevanja nekaterih osebnostnih lastnosti posameznika, na primer kognitivnih sposobnosti in psihiatričnih stanj (Muotri in Gage, 2006).

2.6.1 Diferenciacija embrionalnih matičnih celic v živčne celice *in vitro*

Metode za diferenciacijo EMC v živčne celice sledijo dvema glavnima strategijama: lahko gre za »induktivni« pristop – celice so izpostavljene signalom, ki oponašajo okolje, ki v embriju proizvaja nevroektoderm ali pa za »pasivni« pristop, pri čemer celice v nizki koncentraciji nasadimo v medij brez seruma in jim onemogočimo stik s signali, ki bi zavirali njihovo nevralno usodo; s tem sprožimo privzet mehanizem diferenciacije (Cai in Grabel, 2007).

Pri induktivnem pristopu celice oblikujejo aggregate EMC, ki se imenujejo embrioidna telesca (EB, angl.: embryoid bodies), s tem oponašajo naravno okolje. Te multicelularne strukture so podobne notranji celični masi blastociste in se lahko diferencirajo v celice vseh treh zarodnih plasti. Tudi izražanje genov pri EB je podobno kot pri razvijajočem se embriju (Gajovic in sod., 1997). Za vzpostavitev ustreznega protokola za diferenciacijo EMC v živčne celice je potrebno, da so EB izpostavljena ustreznim molekulam; kot posledica nastanejo strukture, ki ustrezajo tistim *in vivo* (BMP antagonisti, FGF, Wnt). Endoderm, ki se oblikuje na zunanjji strani EB tako uravnava nevroektodermalno diferenciacijo. (Cai in Grabel, 2007, Rathjen in sod., 2002, Maye in sod., 2004).



Slika 5: Shematski prikaz diferenciacije EMC v kulturi. Z različnimi rastnimi faktorji se lahko EMC diferencirajo v različne celične type. Prvi korak pri diferenciacijski poti je nastanek epiblastne populacije iz EMC, gojenih v kulturi. Po indukciji z Wnt, aktivinom, BMP4 ali serumom nastane populacija celic, podobna primitivni progi (celice, obrobljene z modro). Če se te signalne poti ne aktivirajo, se bo populacija diferencirala v ektodermalno linijo. Diferenciacijo ektoderma blokirajo BMP, Wnt in aktivin. Po indukciji primitivne proge (PP), bodo celice posteriorne PP podvržene diferenciaciji v mezoderm, celice anterioarne PP pa diferenciaciji v ektoderm. V tej faziji te usode še niso dokončne, saj lahko aktivin inducira nastanek ektoderma iz posteriorne PP (prirejeno po Murry in Keller, 2008).

Pri drugem, »pasivnem«, pristopu pa želimo v celicah sprožiti privzet mehanizem diferenciacije, tako da jim onemogočimo medcelične interakcije in signaliziranje. Ta pristop načeloma ne vključuje nastanka EB, saj so celice redko nasajene. Tako torej ni signaliziranja z zunanjimi deli, ki bi uravnivali diferenciacijo (Cai in Grabel, 2007). Celice gojimo v nevrobazalnem mediju brez seruma in z malo nutrienti, ta podpira rast ŽMC in vsebuje apoptotske ne-nevralne derivate ter signalne molekule, ki so sicer prisotne v serumu (Reynolds in Weiss, 1996).

Nekatere metode vključujejo kombinacijo obeh pristopov, tako da spodbujajo nastanek EB (lahko ob prisotnosti rastnih faktorjev), čemur sledi linijsko specifična selekcija z določenim medijem (Cai in Grabel, 2007; Li in Zhang, 2006).

Uspešnost diferenciacije MC v živčne celice preverimo na več nivojih, eden od njih je prisotnost specifičnih označevalcev živčnih celic. Nekateri od teh so navedeni v Preglednici 5.

Preglednica 5: Specifični označevalci živčnih celic

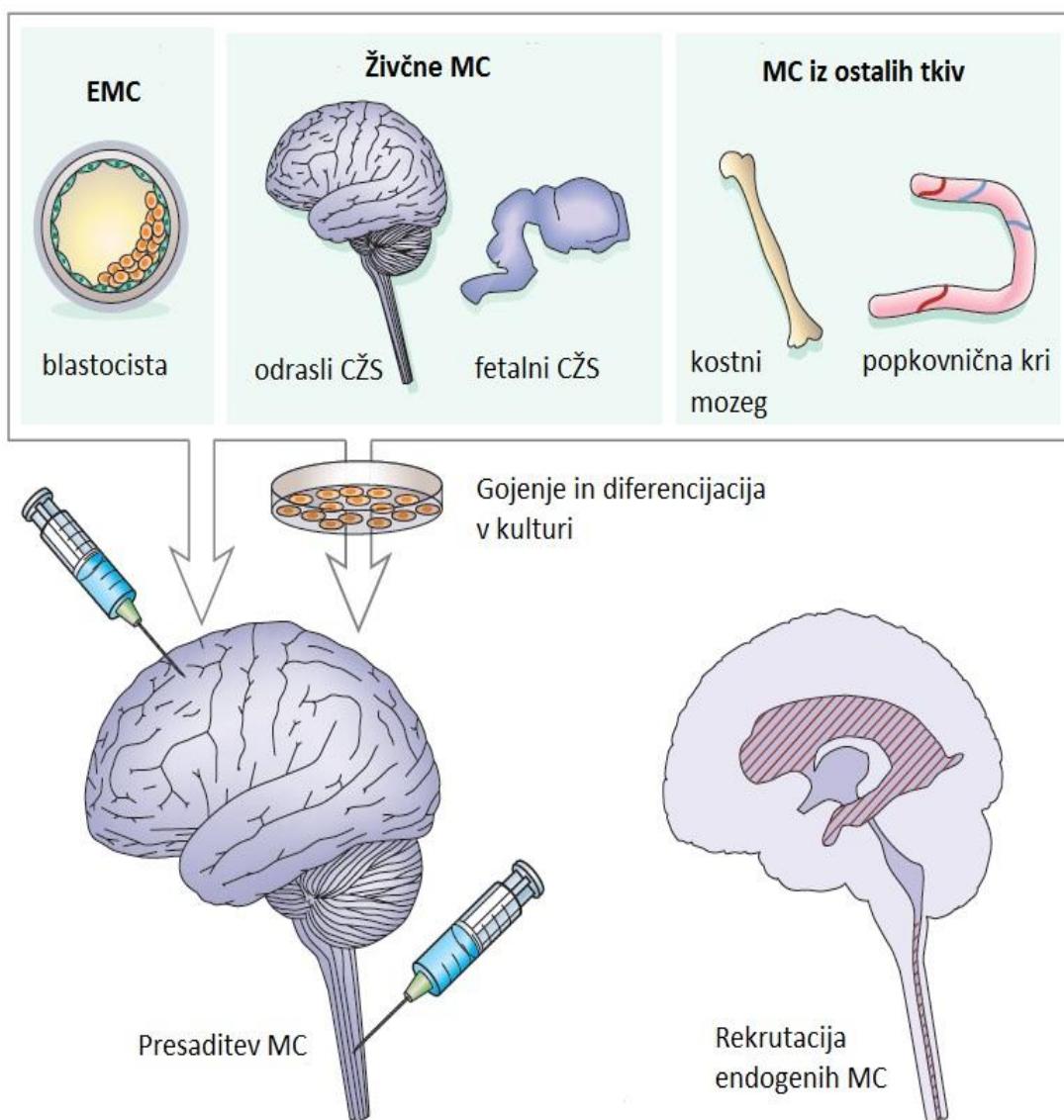
Doublecortin	Z mikrotubuli (MT) povezan protein, značilen skoraj izključno za nezrele nevrone. Pri živčnih prekurzorjih se izraža približno 2 do 3 tedne po izstopu celice iz celičnega cikla in se neha izražati, ko se začnejo izražati označevalci zrelih nevronov (Gleeson in sod., 1998, Francis in sod., 1999).
GFAP (angl.: glial fibrillary acidic protein)	IF tipa III, glavna struktturna komponenta astrocit, pri katerih ohranja trdnost in obliko, sodeluje pa tudi pri celičnem gibanju in komunikaciji. V veliki meri se izraža po poškodbi možganov, ko pride do proliferacije (aktivacije) astrocit, najdemo pa ga tudi pri drugih tipih celic (Eng in sod., 2000).
MAP-2	Z MT povezan protein, verjeteno udeležen pri združevanju MT, kar je ključni korak pri nevrogenezi. MAP2 stabilizira rast MT s povezovanjem MT in IF ter drugih MT (Johnson in Jope, 2004).
Musashi 1	Kodira člana evolucijsko ohranjene družine proteinov Musashi, ki so pri sesalcih pomembni za določanje celične usode in za ohranjanje matičnosti ozioroma diferenciranosti celice. Musashi 1 se selektivno izraža pri živčnih progenitorskih celicah, vključno s živčnimi MC (Okano in sod., 2002).
Nestin	Intermediarni filament (IF) tipa IV, ki se izraža predvsem v zgodnjih predniških celicah živčevja, kjer sodeluje pri radialni rasti aksonov. V celici tvori polimere z drugimi molekulami. Med razvojem se prehodno izraža tudi v drugih vrstah celic. Največ ga je v matičnih celicah subventrikularne cone. Pri odraslem ga v živčnih celicah zamenjajo druge vrste nevrofilamentov. Ponovno se začne izražati le v patoloških okoliščinah, kot je npr. brazgotinjenje glialne poškodbe, po možganski kapi in med obnavljanjem poškodovane mišice. Nestin je zato celični označevalec nevralnih progenitorjev (Michalczyk in Ziman, 2005).
NF-200 (Nevrofilament 200)	10 nm debeli IF, z molekulske težo med 200 in 220 kDa značilni za nevrone, kjer se med rastjo aksona podenote dinamično dodajajo vzolž in na koncih filimenta. Po končani rasti aksona se njegov premer poveča tudi do 5×, kar se zgodi zaradi medsebojnega odbijanja polarnih nevrofilamentov (Hoffman in sod., 1987).
PSD-95	Protein iz družine membransko vezanih gvanilatnih ciklaz (MAGUK), ki se nahaja skoraj izključno pri citoskeletalno specializiranih delih postsinaptičnih nevronov (PSD) in je pomemben za vsidranje membranskih proteinov (nevrotransmiterskih receptorjev), ki se v tem delu nahajajo v veliki gostoti (El-Husseini in sod., 2000).
Vimentin	Kodira intermediarne filamente tipa III, ki vzdržujejo celično obliko, inegriteto citoplazme in stabilizirajo citoskeletalne

	interakcije. Udeleženi pa so tudi pri imunskem odgovoru in transportu lipoproteinov. Izraža se pri različnih ne-epitelnih celicah, še posebej pri mezenhimskih celicah (Osborn in sod., 1984).
--	--

2.7 ZDRAVLJENJE OKVAR ŽIVČEVJA Z MC

Okvare živčnega sistema so lahko posledica travme (ponavadi padca ali prometne nesreče), lahko so podedovane (genetske) ali pa so posledica bolezni. Take okvare so poškodbe hrbtenjače (paraplegija, tetraplegija), posledice možanske kapi, Alzheimerjeva bolezen (bolezen živčevja, ki poškoduje spomin, razmišljanje in razum), amiotrofna lateralna skleroza (poškoduje motonevrone in sčasoma onemogoči gibanje vseh telesnih mišic), Parkinsonova bolezen (progresivna bolezen, pri kateri odmirajo celice kontrolnega centra za gibanje v možganih, kar povzroči izgubo kontrole nad govorom in gibanjem), poliomielitis (virusna okužba, ki poškoduje CŽS in povzroči paralizo), Huntingtonova bolezen (dedovana, progresiva bolezen, ki povzroča nekontrolirane gibe in mentalno oslabljenost), epilepsija (okvara živčevja z značilnimi napadi s krči in izgubo zavesti), migrene, sindrom karpalnega kanala (okvara zaradi stiska medianega živca v zapestju, ki vodi v omrtvičenje in mravljinčenje) (Silbernagl in Lang, 2000).

Matične celice bi lahko predstavljale neizčrpen vir nevronov in glija celic za zdravljenje živčnih bolezni. Primerne bi bile tako EMC kot tudi živčne MC odraslega in celo MC odraslega iz drugih tkiv, na primer iz kostnega mozga. MC bi izolirali in presadili v okvarjene možgane ali hrbtenjačo bodisi direktno bodisi po gojenju in diferenciaciji v kulturi, s čimer bi usmerjeno diferencirali določen tip nevronov ozziroma glija celic. Obstaja pa tudi strategija zdravljenja, pri kateri bi stimulirali bolnikove lastne popravljjalne mehanize. Rekrutirali bi njegove endogene MC, da bi proizvedle nove živčne celice na okvarjenih mestih. MC bi klinično služile kot nadomestki živčnih celic, sodelovale pri ponovni mielinizaciji poškodovanih nevronov ali pri zaščiti živčevja (slika 5) (Lindvall in Kokaia, 2006).



Slika 6: Aplikacije MC za zdravljenje živčnih okvar.

Čeprav so raziskave odraslih in embrionalnih MC za zdravljenje živčnih okvar številne, je bil prvi klinični preizkus z uporabo EMC odobren šele lani. Ameriška FDA je odobrila fazo I kliničnega preizkusa biotehnološkemu podjetju Geron za uporabo EMC pri zdravljenju paraplegikov s poškodbami hrbtnega živca. Trenutno se odvijajo raziskave uporabe oligodendroцитov, pridobljenih iz EMC, za zdravljenje poškodb hrtnega živca (Levičar in sod., 2009).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 DIFERENCIACIJA MC V ŽIVČNE CELICE *IN VITRO*

3.1.1 Material

Aparature, ki smo jih uporabili pri izvedbi raziskovalnega dela:

- Celični analizator Vi-CELL XR (Beckman Coulter, ZDA)
- Centrifuga (Eppendorf, Nemčija)
- CO₂ Inkubator - HeraCell 150 (Thermo Fisher Scientific, ZDA)
- Delovna postaja (K-Systems, Danska)
- Flourescentni mikroskop Observer 1 (Zeiss, ZDA)
- Invertni Mikroskop Eclipse TE300 (Nikon, Japonska)
- Laminar (Iskra Pio, Slovenija)
- Lupa (Nikon, Japonska)
- Mikropipete (Eppendorf, Nemčija)
- Obsevalnik z gama žarki; izotop Cezij 137 (Gama cell 1000)
- Posode s tekočim dušikom
- Računalniški program NIS Elements
- Termoblok HLC

Seznam uporabljenega materiala za enkratno uporabo:

- Brizge - 20 mL (Dispomed, Nemčija)
- Centrifugirke -15 mL, 50 mL (Corning, ZDA)
- Epruvete (BD Falcon, ZDA)
- Epruvete z antikoagulantom
- Filtri - 0,20 µm (Corning, ZDA)
- Gojilne posodice s 24 luknjicami (Costar, ZDA)
- Gojilne posodice s 4 luknjicami 24 IVF (Nunc, Danska)
- Krioviale - 2 mL (Corning, ZDA)
- Mikrocentrifugirke (Eppendorf, Nemčija)
- Petrijevke - 40 × 11 mm (TPP, Švica)
- Pipetni nastavki - 10 µL 100 µL, 1000 µL (Eppendorf, Nemčija)
- Plastenka za gojenje celičnih kultur - T75 cm² (Costar, ZDA)
- Rokavice (Kimberly Clark, ZDA)
- Serološke pipete - 10 mL, 5mL (Sarstedt, Nemčija)
- Skalpel (Brand, Nemčija)
- Strgallo - 24 cm (TPP, Švica)
- Transfer pipete - 3,5 mL (Sarstedt, Nemčija)

Seznam uporabljenih kemikalij:

- B27 supplement (Gibco, ZDA)
- BDNF (Immunotools, Nemčija)
- bFGF (Immunotools, Nemčija)
- bFGF (R&D Systems, ZDA)
- DMEM F/12 (Invitrogen, ZDA)
- DMEM KO (Invitrogen, ZDA)
- DMSO (Sigma, ZDA)
- Etilen glikol (Sigma, ZDA)
- FBS (Invitrogen, ZDA)
- Ficoll-paqueTM premium 1,073 (GE Healthcare, Velika Britanija)
- IMDM - 1× (Invitrogen, ZDA)
- Kolagen IV (Sigma, ZDA)
- L-glutamax (Invitrogen, ZDA)
- MSCBM (Lonza, Švica)
- N2 supplement (Gibco, ZDA)
- Ne-esencialne aminokisline (Invitrogen, ZDA)
- Neurobasal medium (Gibco, ZDA)
- PBS brez Ca²⁺, Mg²⁺ (Invitrogen, ZDA)
- Penicilin/Streptomicin (Invitrogen, ZDA)
- Retinojska kislina (Sigma, ZDA)
- Saharoza (Sigma, ZDA)
- Serum replacement - SR (Invitrogen, ZDA)
- Trireagent (Sigma, ZDA)
- Trypsin- EDTA (Invitrogen, ZDA)
- B-marcapto etanol (Life Technology, ZDA)

3.1.2 Diferenciacija EMC v živčne celice

Celično linijo EMC smo prejeli iz laboratorija dr. Outi Hovatta z univerze Karolinska, Stockholm (Švedska) in jo nato gojili v celičnem laboratoriju Zavoda RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani. In vitro diferenciacijo smo izvedli po protokolu, prirejenem po protokolu, namenjenem diferenciaciji MC iz popkovnične krvi, ki ga je objavila raziskovalna skupina iz Newcastle v Angliji (McGuckin in sod., 2008).

Za gojenje EMC potrebujemo petrijevke z vsaj 3 dni starimi mitotsko inaktiviranimi fibroblasti, ki služijo kot hranilna plast. Uporabimo lahko človeške fibroblaste iz kože ali mišje embrionalne fibroblaste; oboji so komercialno dostopni. Pred diferenciacijo smo torej gojili dve vrsti celic: EMC in fibroblaste. V fazi priprave hranilnih plasti smo s pogoji gojenja favorizirali fibroblaste, zato smo uporabili gojišče, namenjeno posebej fibroblastom. Ko pa smo na plošče nasadili EMC, smo uporabili medij, namenjen ohranjanju nediferenciranih EMC v kulturi.

3.1.2.1 Priprava hranilnih plasti

Najprej smo odmrznili zadostno število vial s fibroblasti in jih nasadili v platenke za gojenje celičnih kultur (T75) z medijem, ki je vseboval FBS. Medij s FBS smo uporabljali ves čas razmnoževanja oziroma ekspanzije celic, ki je trajala približno 4 dni. Ko so bile celice konfluentne, smo jih tripsinizirali in prešteli s celičnim števcem Vi-cell, ki je namenjen štetju celic ter določanju njihove velikosti in vitalnosti. Del tripsiniziranih celic smo uporabili za hranilne plasti, del pa smo jih naprej namnoževali v mediju s FBS. Celice so za hranilne plasti uporabne do pasaže 16. Del celic, ki smo jih namenili uporabi za hranilne plasti, smo mitotsko inaktivirali z obsevanjem z gama žarki in jih v ustremnem številu (konfluentna rast) nasadili v petrijevke. Naslednji dan smo medij s FBS zamenjali z medij s SR. Čez približno 3-4 dni so bile tako pripravljene celice primerne hranilne plasti za gojenje EMC.

3.1.2.1.1 *Odmrzovanje vial s fibroblasti*

Pripravili smo vodno kopel s temperaturo 37° C in iz tekočega dušika vzeli viale z zamrznjenimi fibroblasti ($1,5 \times 10^6$ celic/vialo). Viale smo postavili v kopel za približno 3 minute oziroma dokler ni bilo v viali samo še čisto malo ledu. Viale smo očistili z etanolom in jih postavili v laminar. Vsebino vial smo prenesli v 15 mL centrifugirko in vialo dvakrat sprali s 500 mL FIB FBS medija. Nato smo 7 minut centrifugirali na $400 \times g$ in s pipeto odstranili supernatant. Celice smo resuspendirali v 4-5 mL FIB FBS medija in jih nasadili v gojilne platenke (T75) (1 platenka približno zadošča vsebini 1 viale). Volumen medija ob nasaditvi je bil 13 mL. Naslednji dan smo medij zamenjali in dodali 15 mL medija.

3.1.2.1.2 *Priprava medija za namnoževanje fibroblastov*

Medij za namnoževanje fibroblastov sestavlja IMDM (1×) ali DMEM F-12, FBS in Pen/Strep. Ta medij smo uporabili tudi, ko smo nasadili mitotsko inaktivirane fibroblaste, saj FBS v mediju omogoča lažje pritrjanje fibroblastov na dno plastične posodice za gojenje. Ker pa FBS povzroča tudi diferenciacijo EMC, smo naslednji dan po nasajevanju obsevanih fibroblastov medij zamenjali z MFIB SR medijem, ki namesto FBS vsebuje njegov nadomestek (SR).

Za pripravo 50 mL medija smo zmešali 44,75 mL IMDM (1×), 5 mL FBS in 0,25 mL Pen/Strep.

3.1.2.1.3 *Tripsinizacija*

Med rastjo v kulti uradno rastejo v obliki enosloja in se pritrjajo na podlago. Pri opravljanju pasaž ali pri odstranjevanju celic iz gojivne posode moramo celice odlepiti z dna. Najlažji način za odstranitev celic je tretiranje kulture s tripsinom ali kombinacijo tripsin-EDTA. Tripsin namreč deluje na vlakna med celicami tako, da jih razcepi. Njegovo

optimalno delovanje je pri pH med 7,4 in 7,6. Je toksičen in pri predolgem delovanju lahko poleg povezav poškoduje tudi same celice. Pri redčenju tripsina moramo uporabljati medij brez Ca^{2+} ali Mg^{2+} .

Pred postopkom smo vse kemikalije najprej postavili za pol ure v termoblok na 37°C. Postopek smo izvajali v laminarju, ki smo ga pred tem razkužili s 70% etanolom. Enako smo naredili z vsakim predmetom, preden smo ga položili v laminar. Iz inkubatorja smo vzeli celično kulturo in celice pogledali pod mikroskopom. Celice, ki so se odlepile, so bile okrogle oblike. Kjer jih je bilo preveč, so rasle v gostih skupkih. Nato smo celično kulturo nesli v laminar. Gojišče s plavajočimi odlepljenimi celicami smo odpipetirali s transfer pipeto in zavrgli. Kulturo smo še dvakrat sprali s PBS brez Ca^{2+} ali Mg^{2+} . PBS smo odstranili s serološko pipeto in izperek zavrgli. Pri pipetiranju smo pazili, da se nismo dotaknili vratu flaške in da smo spirali nežno. Celicam, ki so po spiranju ostale v flaški, smo dodali ustrezno količino raztopine tripsin-EDTA (toliko, da je prekrila kulturo) in postavili v inkubator (37°C in 5 atm CO_2) za 5 minut oziroma največ za 10 min. Postopek odlepljanja celic smo tudi opazovali pod mikroskopom. Odlepljene celice so bile videti manjše in bolj okrogle kot pritrjene. Čas popolnega odlepljanja celic od podlage je odvisen od tipa celic, gostote populacije, koncentracije serumu v mediju za gojenje, potencialnosti tripsina in časa od zadnje pasaže. V vsakem primeru mora biti čas izpostavljenosti tripsinu minimalen, da ne pride do poškodbe celic in izgube kulture. Po 5 (ozioroma največ 10) minutah smo tripsinizirani kulturi hitro dodali gojišče z 20% serumom, da smo inhibirali nadaljnje delovanje tripsina. S serološko pipeto smo nežno resuspendirali celično suspenzijo, da bi razbili morebitne skupke. Nato smo s transfer pipeto prenesli kulturo tripsiniziranih celic z medijem v svežo 50 mL centrifugirko in centrifugirali 5 minut na 400×g pri sobni temperaturi. Po centrifugiraju smo odlili supernatant in celice resuspendirali v najmanj 25 mL medija z 20% serumom ter ponovno centrifugirali. Po spiranju smo celice resuspendirali v primerni količini medija za gojenje celic ter celično suspenzijo prenesli v novo gojilno posodo, kamor smo dodali še nekaj medija. Pod mikroskopom smo preverili, ali se celice že začenjajo prilepljati na dno in ne plavajo več po mediju. Staro gojilno posodico smo zavrgli. Preden smo kulturo postavili v inkubator, smo jo še enkrat pošpricali z alkoholom in ji, če smo jo nasadili v gojilno plastenko brez filtra, odvili pokrovček, da smo omogočili vstop zraka v kulturo.

3.1.2.1.4 Obsevanje in nasaditev mitotsko inaktiviranih fibroblastov

Fibroblaste smo pred obsevanjem z gama žarki tripsinizirali po zgoraj opisanem postopku in jih po spiranju resuspendirali v vsaj 20 mL PBS. Nato smo jih kar v 50 mL centrifugirkah obsevali s 120 Gray-i. Po obsevanju smo jih centrifugirali 5 minut na 400×g in jih resuspendirali v 1 mL medija. Celice smo prešteli in razredčili v ustreznom volumnu medija FIB FBS in jih v ustremnem številu nasadili v petrijevke (60 000 fibroblastov/cm²). Naslednji dan smo FIB FBS medij zamenjali z MFIB SR medijem. Medij za nasaditev fibroblastov namreč mora vsebovati FBS, saj se sicer celice ne bi pritrdile na podlago. Ko pa se celice pritrdijo in medij zamenjamo, mora le-ta vsebovati SR, saj FBS povzroča diferenciacijo EMC.

Za pripravo 50 mL medija smo zmešali 44,75 mL IMDM, 5 mL SR in 0,25 mL Pen/Strep. Medij smo filtrirali in shranili v hladilniku. Tako shranjen je uporaben 1 teden.

Hrnilne plasti za rast EMC so bile tako pripravljene. Pripravljene hrnilne plasti lahko uporabimo po 3 dneh (uporabne naj bi bile največ 5 dni).

3.1.2.2 Gojenje EMC

3.1.2.2.1 Priprava medija za gojenje EMC (EMC SR – serum replacement medij)

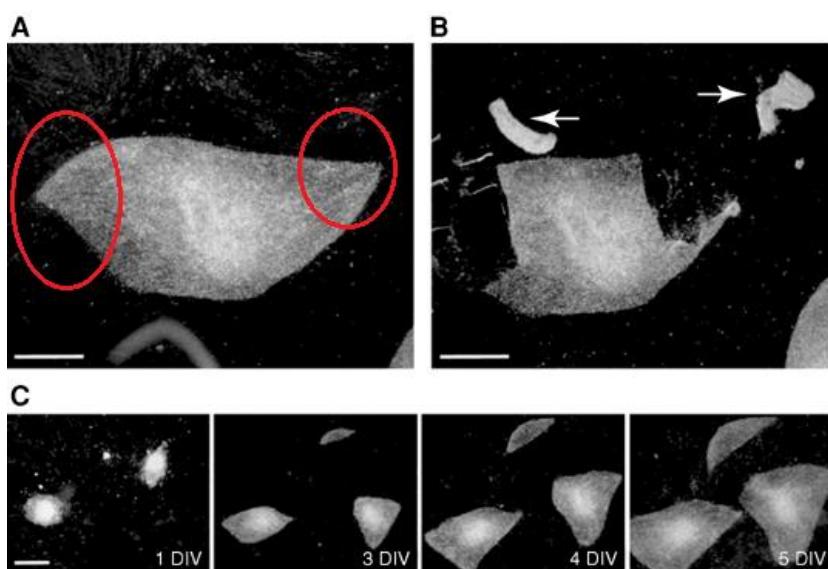
Za pripravo 50 mL medija smo zmešali 38,65 mL DMEM KO ; 10,00 mL SR; 500 µL L-glutamax-a; 500 µL ne-esencialnih aminokislin; 250 µL Pen/Strep in 100 mL B-markaptoetanola. Tik pred uporabo smo dodali še 50 µL b-FGF. Medij z dodanim b-FGF ni stabilen, zato je uporaben največ 1 dan po pripravi, pripravljen EMC SR medij brez b-FGF pa filtriramo skozi 20 µL filtre in ga lahko shranimo v hladilniku za 1 teden.

Medij EMC SR smo menjavali vsak dan oziroma šestkrat tedensko in sicer zelo previdno, da ne bi poškodovali hrnilnih plasti in kolonij EMC na dnu posodice.

3.1.2.2.2 Presajanje (splittinig) EMC

Presajanje celic se lahko izvaja encimsko ali mehansko. Metoda z uporabo encimov naj ne bi bila tako uspešna, saj naj bi vpivala na diferenciacijo EMC in na izražanje genov. Zato smo izbrali mehansko metodo.

Za presajanje EMC morajo imeti kolonije dobro definiran rob, delov kolonij, kjer rob ni dobro definiran, nismo presajali. Prav tako nismo presajali delov v sredini kolonije, kjer so kolonije svetlejše barve. Tam so tam celice namreč že diferencirane in rastejo v več plasteh. Te dele smo zavrgli. V novo petrijevko s hrnilnimi plastmi smo torej presadili nediferencirane dele kolonij, ki so na Sliki 7 obkroženi z rdečo barvo.



Slika 7: Mehansko presajanje EMC. (A) Kolonija EMC, primerna za presajanje. (B) Ista kolonija, razrezana na dva kosa (puščice). (C) Dva kosa kolonije po 1, 3, 4 in 5 dneh in vitro (DIV) gojenja na hranilnih plasteh (Martín-Ibáñez in sod., 2009).

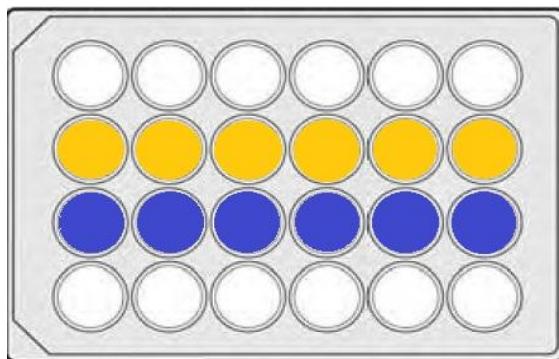
Presajanje smo izvajali v posebni brezprašni komori (delovna postaja K-Systems) pod lupo v čim bolj sterilnem okolju. Pred postopkom smo vsaj za 30 minut (še bolje za eno uro) postavili medij EMC SR v inkubator na 37°C. Izbrali smo petrijevke s hranilnimi plastmi in v njih vsaj 30 minut pred uporabo zamenjali FIB FBS medij z EMC SR medijem tako, da smo dodali 2/3 končnega volumna medija, in naslednji dan še 1/3 volumna medija, da so imele celice več časa za pritrditev. S skalpelom smo postrgali ustrezne nediferencirane dele kolonij (500-1000 celic/kos). Strgati smo poskušali zelo na rahlo, saj smo tako postrgali čim manj fibroblastov, poleg tega smo pazili, da so bili koščki kolonij popolnoma odrezani od podlage, saj smo jih le tako lahko posrkali v 20 µL pipeto. Iz inkubatorja smo vzeli petrijevke s hranilnimi plastmi, ki smo jim uro pred tem zamenjali medij. Plavajoče koščke kolonij smo pobrali s pipeto in prestavili na novo ploščo, pri čemer smo pazili, da so bili ti koščki enakomerno razporejeni. Na petrijevke (9,6 cm²) smo dali po 20 koščkov. Nato smo zelo počasi in previdno prestavili petrijevke nazaj v inkubator. Med presajanjem smo se izogibali nastajanju zračnih mehurčkov, ki bi potisnili kolonije ob stene, zato bi jih bilo kasneje težko presaditi.

3.1.2.3 Nasaditev in priprava EMC za diferenciacijo v živčne celice

Za pripravo na diferenciacijo smo kolonije EMC nasadili kar na plastično podlago gojilnih posodic s 24 luknjicami. Celice smo nasadili v 3 gojilne posodice, v vsaki smo napolnili 12 luknjic, torej skupno 36 luknjic in sicer v številu 40 000 EMC/cm². Nediferencirane dele kolonij smo postrgali s hranilnih plasti, jih narezali na manjše koščke in jih še prepipetirali, da smo dobili manjše dele.

Celice smo gojili v EMC SR mediju 5 dni oziroma dokler kolonije niso bile dovolj konfluentne za začetek diferenciacije. Ko so bile kolonije približno 80% konfluentne, smo

začeli z diferenciacijo EMC v živčne celice. V polovici luknjic smo medij zamenjali z medijem za diferenciacijo, v polovici luknjic pa smo uporabili kontrolni medij kot je prikazano na Sliki 8.



Slika 8: Shema nasaditve EMC v gojilno posodico. Rumeno obarvane luknjice predstavljajo kontrolo oziraoma celice, gojene v kontrolnem mediju, modro obarvane luknjice pa celice, ki smo jih diferencirali v živčne celice.

3.1.2.3.1 Kontrolni medij

V polovici luknjic, v katerih smo nasadili celice, smo uporabili kontrolni medij, ki naj ne bi povzročil diferenciacije v živčne celice. Za pripravo 50 mL tega medija smo zmešali 44,5 mL DMEM, 5 mL FBS in 0,5 mL Pen/Strep. Ta medij smo kot kontrolni medij uporabljali ves čas poskusa, torej tri tedne, pri čemer smo vsak drugi dan odstranili polovico starega medija in dodali enak volumen svežega medija.

3.1.2.3.2 Medija za diferenciacijo

V drugi polovici luknjic pa smo žeeli doseči diferenciacijo EMC v živčne celice, zato smo uporabili drugačna medija. Najprej smo celice dva tedna gojili v diferenciacijskem mediju, nato pa še en teden v maturacijskem mediju.

Za pripravo 50 mL diferenciacijskega medija smo zmešali:

DMEM / F12/ glutamax	44 mL
FBS	5 mL
EGF (10 ng/mL)	5 µL
BDNF (10 ng/mL)	50 µL
Retinojska kislina (5µM)	5 µL
Kolagen IV (1 µg/mL)	50 µL
Pen/Strep (1:100)	500 µL

Tak medij smo uporabljali 2 tedna, pri čemer smo vsak drugi dan odstranili polovico starega medija in dodali enak volumen svežega medija.

Po dveh tednih smo diferenciacijski medij zamenjali za maturacijskega, ki smo ga na isti način uporabljali nadaljni teden.

Za pripravo 50 mL maturacijskega medija smo zmešali:

DMEM / F12 / glutamax	44 mL
FBS	5 mL
EGF (10 ng/mL)	5 µL
NGF (10 ng/mL)	25 µL
BDNF (10 ng/mL)	50 µL
Retinojska kislina (5 µM)	5 µL
dBcAMP (100 µM)	50 µL
Kolagen IV (1 µg/mL)	50 µL
Pen/Strep (1:100)	500 µL

Preglednica 6: Sestavine medijev za gojenje in diferenciacijo

FBS (fetalni goveji serum, angl: fetal bovine serum)	Del plazme, ki ostane po koagulaciji krvi, med procesom, pri katerem se plazemski protein fibrinogen pretvori v fibrin. FBS ima širok spekter uporabe v celični biologiji, saj vsebuje zelo malo protiteles in kar nekaj rastnih faktorjev. Glavna komponenta seruma je globularni protein BSA (goveji serumski albumin, angl.: bovine serum protein), ki omogoča preživetje, rast in delitve celic v kulturi. (Vir: Serum, Encyclopedia Britanica...2009)
EGF (epidermalni rastni faktor, angl.: epidermal growth factor)	Rastni faktor, ki ima pomembno vlogo pri regulaciji celične rasti, proliferacije in diferenciacije. Z visoko afiniteto se veže na receptor EGFR, ki se nahaja na celični površini, in stimulira intrinzično tirozin-kinazno aktivnost, ki povzroči kaskado reakcij signalne transdukciije, to po se odraža v različnih biokemijskih spremembah znotraj celice: dvig znotrajcelične koncentracije kalcija, povečani glikoliza in sinteza proteinov, povečano izražanje nekaterih genov, ki vodijo v sintezo DNA in celično proliferacijo (Carpenter in Cohen, 1990).
FGF (fibroblastni rastni faktorji, angl.: fibroblast growth factors)	Družina rastnih faktorjev, ki se veže na heparin in aktivira več subtipov receptorjev. Vloge v razvojnih procesih vključujejo indukcijo mezoderma, indukcijo razvoja in razvoj živčnega tkiva, antero-posteriorno organizacijo in razvoj udov, pri odraslih tkivih pa organizacijo keratinocitov, celjenje ran in angiogenezo (Ornitz in Itoh, 2001).
BDNF (angl.: brain-derived neurotrophic factor)	Član družine rastnih faktorjev – nevrotropinov, ki jih najdemo v možganih in v perifernem živčnem sistemu, kjer omogočajo preživetje obstoječih nevronov in spodbujajo rast in diferenciacijo novih nevronov ter sinaps. Med nevrotropini, ki omogočajo nevrogenezno iz MC pri odraslem osebku, je BDNF najbolj pomemben. Motnje v delovanju BDNF so povezane s številnimi boleznimi, na primer z depresijo, shizofrenijo,

	Alzheimerjevo boleznijo, demenco... (Binder in Scharfman, 2004).
RETINOJSKA KISLINA (RA, angl.: retinoic acid)	Oksidirana oblika vitamina A. Njena vloga je pomembna pri določanju pozicije vzdolž anteriorno-posteriorne osi pri embrionalnem razvoju strunarjev. Deluje skozi Hox gene, najprej se veže na heterodimerne RA receptorje (RAR) in retinoidne X receptorje (RXR), ki se nato vežejo naprej na tarčne regulatorne regije, s čimer aktivirajo gensko transkripcijo (npr. Genov Hox). Odgovor je odvisen od tarčne celice, saj RA uravnava transkripcijo različnih genov (Marshall in sod., 1996)
KOLAGEN IV	Protein, tip kolagena, ki tvori ekstracelularni matriks in ga primarno najdemo v bazalni lamini pa tudi v drugih tkivih, na primer v očesni leči, placenti in ledvičnih glomerulih. Bazalna lamina celicam daje podporo, jih loči od mezenhimskega vezivnega tkiva in dinamično uravnava njihovo rast, diferenciacijo in prostorsko orientacijo (Khoshnoodi in sod., 2008).
NGF (angl.: neural growth factor)	Majhen protein iz družine nevrotropinov (prvi opisan), pomemben za rast, vzdrževanje in preživetje simpatičnih in senzoričnih nevronov, povzroča namreč razvejanje in podaljšanje aksonov. Brez njega so te celice podvržene apoptozi. NGF naj bi tudi krožil po celotnem krvnem obtoku in s tem ohranjal homeostazo (Fiore in sod., 2009).
dBcAMP (angl.: Dibutyryl cAMP sodium salt)	Analog naravne signalne molekule cAMP, ki deluje kot sekundarni sporočevalec in aktivira od cAMP odvisne proteinske kinaze ter tako sodeluje pri raznih signalnih transdukcijah (Strickland in sod., 1980).

3.1.3 Diferenciacija odraslih MC v živčne celice

In vitro diferenciacijo v živčne celice smo poskušali izvesti z odraslimi MC, pridobljenimi iz kostnega mozga (KM). Najprej smo uporabili Protokol 1, po katerem smo že diferencirali EMC. Nato pa smo poskusili še s protokolom, ki smo ga priredili po protokolu, namenjenem diferenciaciji odraslih MC (Protokol 2, Hermann in sod., 2004).

3.1.3.1 Pridobivanje vzorcev kostnega mozga

MC za diferenciacijo smo pridobili iz približno 5 mL aspirata kostnega mozga pri diagnostični punkciji KM na Kliničnem oddelku za hematologijo Kliničnega centra v Ljubljani. Postopek punkcije je opravil odgovorni zdravnik Kliničnega oddelka za hematologijo, ki je pred postopkom bolnika tudi seznanil z našo raziskavo.

Za delo z omenjenimi vzorci smo dne 18.03.2008 dobili soglasje Komisije za medicinsko etiko 210/03/08 za študijo »Uporaba humane matične celice za zdravljenje«. Pred odvzemom KM pa smo dobili tudi prostovljni pristanek bolnika, iz katerega je razvidno, da je seznanjen z namenom odvzema ter, da se z njim strinja (priloga). Pri samem delu smo upoštevali določila Oviedske konvencije, Helsiške deklaracije in določbe Kodeksa medicinske deontologije Slovenije.

Odvzeti vzorec KM smo do nadaljevanja postopka izolacije shranili v epruvetke s antikoagulantom natrijevim citratom.

3.1.3.2 Izolacija mononuklearnih celic iz vzorca KM

KM vsebuje različne tipe celic: stromalne celice (mezenhimske MC, osteoblasti, fibroblasti, retikularne celice in maščobne celice) in krvotvorne MC (Kiel in Morrison, 2008). Z gradientnim centrifugiranjem smo iz KM najprej pridobili mononuklearne celice in sicer smo uporabili gradientni medij fikol Lympholyte® - H.

Lympholyte® - H ima gostoto 1,077 g/mL. Pred uporabo smo ga ogreli na sobno temperaturo. Vzorec KM, shranjen v epruvetki z natrijevim citratom, smo razredčili z enakim volumnom PBS (približno 5 mL). V 15 mL centrifugirko smo s serološko pipeto nanesli 3 mL Lympholyte® - H in nato nanj razredčeni KM (razmerje Lympholyte® - H : razredčenemu KM mora biti približno 1:2). Pri nanašanju smo pazili, da nismo pomešali faz. Tako pripravljene centrifugirke z vzorčki smo 30 minut centrifugirali na 400×g. Med centrifugiranjem celice glede na svojo gostoto potujejo različno daleč vzdolž vertikalne osi raztopine. Eritrociti agregirajo, zato se jim poveča hitrost sedimentacije in se po centrifugiranju nahajajo v peletu na dnu centrifugirke. V peletu se po ločevanju nahajajo tudi granulociti. Limfociti, monociti in trombociti nimajo dovolj velike gostote, da bi penetrirali v plast fikola, zato se po ločevanju nahajajo med plazmo in fikolom. Vidni so kot bel obroček. Tu se nahajajo tudi MC. Sloj MNC, ki se je nahajal med Lympholyte® - H in plazmo, smo s transfer pipeto previdno pobrali in prenesli v novo 15 mL centrifugirko, ga do vrha razredčili s PBS in ponovno centrifugirali 7 minut na 400×g. Pelet, ki smo ga dobili po drugem centrifugiranju smo za 15 sekund razredčili z vodo, da bi se znebili morebitnih eritrocitov, nato dodali PBS in vse skupaj še tretjič centrifugirali 7 minut na 400×g. Tako pridobljeni pelet smo resuspendirali v mediju za gojenje in ga nasadili na plošče.

3.1.3.3 Gojenje celic iz KM

KM, iz katerega smo izolirali celice za nadaljnjo diferenciacijo, smo v skladu z internim seznamom odvzetih vzorcev KM Zavoda RS za transfuzijsko medicino, poimenovali KM8. Celice, ki smo jih pridobili z ločevanjem, smo najprej gojili v 75 cm² plastenki za gojenje. Dno plastenke smo pred nasaditvijo prekrili s FBS, ki mezenhimskim MC omogoča lažjo pritrditev na podlago. S tem smo tudi favorizirali gojenje teh celic. Celice smo nasadili v komercialno dostopnem mediju MSCGM (Mesenchymal Stem Cell Growth Medium), ki je namenjen gojenju večjega števila mezenhimskih MC in ohranjanju njihovega

nediferenciranega stanja. Gojilno plastenko smo postavili v inkubator (37°C in 5% CO_2) in po nekaj dneh, ko so se celice dobro pritrstile, zamenjali celoten star medij s svežim. Na ta način smo se tudi znebili eritrocitov, ki bi se še vedno lahko nahajali v naši kulturi. Celice v kulturi so rasle mesec dni, pri čemer smo jim skoraj celoten medij menjavali na 3-4 dni. V tem mesecu smo jih trikrat tripsinizirali. Nato smo jih še zamrznili ter odmrznil in jih razsadili v 3 gojilne plastenke. Po mesecu dni smo imeli torej celice KM8 v peti pasaži.

3.1.3.4 Zamrzovanje celic

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

Za zamrzovanje enega vzorca smo pripravili 2 ml medija in sicer smo zmešali: 1 ml FBS, 0,75 ml DMEM ter 0,25 ml DMSO.

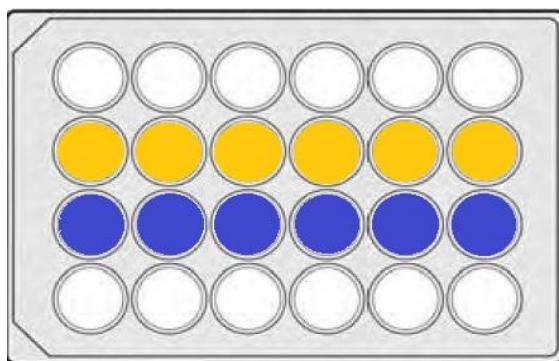
3.1.3.5 Odmrzovanje celic

Epruvetke za zamrzovanje z zamrznjenimi celicami smo vzeli iz posode s tekočim dušikom in jo na hitro odtalili pri 37°C . Med odtajevanjem smo celicam s pipeto dodajali serum in jih prestavliali v 50 ml centrifugirko. S hitrim delom in dodajanjem seruma smo preprečili toksično delovanje DMSO. Celicam smo nato dodali 10 ml gojilnega medija in homogenizirali suspenzijo s stresanjem na rotacijskem stresalniku. Spiranje smo ponovili, nato pa določili število in odstotek živih celic s pomočjo naprave Vi-cell.

3.1.3.6 Diferenciacija mezenhimskih MC v živčne celice

Postopek *In vitro* diferenciacije MMC smo izvedli po zgoraj opisanem protokolu za diferenciacijo EMC (protokol 1).

Poleg tega pa smo za poskusili tudi diferenciacijo MMC, prirejeno po protokolu, objavljenem v Journal of Cell Science (Hermann in sod., 2004) (protokol 2). Tripsinizirane celice KM8p5 iz treh gojilnih plastenk (75 cm^2) smo nasadili v 2 gojilni posodici s 24 luknjicami in sicer smo v vsaki posodici napolnili 12 luknjic z gostoto 100000 celic / cm^2 . V polovico luknjic smo dodali kontrolni medij, v drugo polovico pa smo dodali gojilni medij, s katerim smo želeli inducirati spremembo kulture MMC v nevrosferam podobne strukture (slika 9).



Slika 9: Shema nasaditve MMC v gojilno posodico. Rumeno obarvane luknjice predstavljajo MMC, gojene v kontrolnem mediju, modro obarvane luknjice pa predstavljajo MMC, ki smo jih diferencirali v živčne celice.

Za pripravo 20 mL medija za indukcijo nevrosfer smo zmešali:

DMEM	17,592 mL
FBS	2 mL
L-glutamax	0,2 mL
FGF-2	0,004 mL
EGF	0,004 mL
Pen/Strep	0,2 mL

Za pripravo 20 mL kontrolnega medija pa smo zmešali:

DMEM	17,6 mL
FBS	2 mL
L-glutamax	0,2 mL
Pen/Strep	0,2 mL

Na tak način smo celice gojili 18 dni. Ker so popolnoma preraščale podlago in vidno rasle v več plasteh, smo jih vmes dvakrat tripsinizirali in ponovno nasadili. Nato pa smo jim dodali medij za diferenciacijo nevrosfer, v katerem smo celice gojili še nadaljnih 14 dni. Vmes smo celice opazovali in fotografirali pod mikroskopom ter iz kulture izolirali RNA.

Za pripravo 30 mL medija za diferenciacijo nevrosfer smo zmešali:

Nevrobazali medij	27, 564 mL
FBS	1,8 mL
N2	0,3 mL
BDNF	0,03 mL
Retinojska kislina	0,006 mL
Pen/Strep	0,3 mL

3.2 KARAKTERIZACIJA DIFERENCIACIJE

Uspešnost umetne diferenciacije v živčne celice smo preverili na tri načine. Ves čas poskusa smo opazovali in fotografirali morfološke spremembe celic v kulturi. Diferenciacijo smo kvalitativno ovrednotili z imunofluorescentnim barvanjem s specifičnimi označevalci. Izražanje specifičnih genov pa smo kvantitativno ovrednotili z verižno reakcijo pomnoževanja v realnem času.

3.2.1 Spremljanje morfologije celic z uporabo svetlobnega mikroskopa

Gojene celice smo vsak dan opazovali pod invertnim mikroskopom (Nikon Eclipse TE300) in jih, kadar so bile vidne spremembe morfologije kulture, pod mikroskopom tudi fotografirali.

3.2.2 Imunoflourescentno barvanje celic

3.2.2.1 Material

Seznam uporabljene laboratorijske opreme

- Mikroskop observer Z1 (Zeiss, ZDA)
- Mikropipete (Eppendorf, Nemčija)

Seznam uporabljenega potrošnjega materiala

- Gojilne posodice s 24 luknjicami (Costar, ZDA)
- Transfer pipete - 3,5 mL (Sarstedt, Nemčija)
- Epruvete (BD Falcon, ZDA)
- Centrifugirke (Corning, ZDA)
- Pipetni nastavki – 10 mL, 100 mL, 1000mL (Eppendorf, Nemčija)

Seznam uporabljenih kemikalij

- Primarna protitelesa anti-Vimentin Li-10 mišja monoklonska IgM (Abcam, ZDA)
- Primarna protitelesa anti-Doublecortin kunčja poliklonska IgG (Abcam, ZDA)
- Primarna protitelesa anti-NF200 mišja monoklonska IgG1 (Sigma, ZDA)
- Primarna protitelesa anti-GFAP kunčja poliklonska IgG (Abcam, ZDA)
- Primarna protitelesa anti-PSD95 (kunčja poliklonska IgG) (Abcam, ZDA)
- Primarna protitelesa anti-Nestin mIgG1 (R&D Systems, ZDA)
- Sekundarna protitelesa proti mišjim protitelesom Alexa 488 (Invitrogen, ZDA)
- Sekundarna protitelesa proti kunčjim protitelesom Alexa 488 (Invitrogen, ZDA)
- Triton (Sigma, ZDA)
- PBS (Sigma, ZDA)
- Kozji serum za blokado (Gibco, ZDA)
- Fiksativ Accustain (Sigma, ZDA)
- DAPI (Invitrogen, ZDA)

3.2.2.2 Postopek imunosfluorescentnega barvanja

Glede na objavljene protkole in naše opazovanje celic pod svetlobnim mikroskopom, smo ocenili, kdaj bi bile celice lahko dovolj diferencirane za ugotavljanje prisotnosti označevalcev, značilnih za živčne celice (Preglednica 5). Prisotnost označevalcev smo ugotavljali z imunofluorescentnim barvanjem, to je barvanje s fluorescentno označenimi protitelesi. Pred barvanjem smo celice fiksirali, da smo preprečili razgradnjo proteinov in jih ohranili v čim bolj nativnem stanju ter jim permeabilizirali membrane, da smo omogočili tudi barvanje citoskeletnih elementov, ki se nahajajo znotraj celice.

Za barvanje smo izbrali tiste pare luknjic v gojilnih posodicah, kjer je bila že pod svetlobnim mikroskopom vidna razlika med celicami, gojenimi v kontrolnem in diferenciacijskem mediju.

Najprej smo celicam odstranili gojišče in jih nežno sprali s PBS. Celice smo za 30 minut izpostavili fiksativu Acustain, nato smo ga odstranili in celice trikrat zaporedoma sprali s PBS. PBS smo v gojilni posodici vsakič pustili po 10 minut. Nato smo v posodice za 15-20 minut dodali raztopino 1% Tritona v PBS, jo odstranili in za eno uro dodali novo raztopino, ki je vsebovala 0,1% Tritona in 0,1% kozjega seruma v PBS.

Tako so bile celice pripravljene za dodatek primarnih protiteles. Preverjali smo pristonost označevalcev Nestin-a, GFAP, NF-200, doublecortina, MAP2 in PSD95. Primarna protitelesa smo redčili v raztopini PBS v različnih razmerjih (Preglednica 7).

Preglednica 7 prikazuje razmerja redčenja uporabljenih primarnih protiteles v PBS:

Primarno protitelo	Redčitev v PBS
anti-Nestin	1:80
anti-GFAP	1:800
anti-NF200	1:800
anti-Doublecortin	1:400
anti-MAP2	1:800
anti-PSD95	1:400

Pripravili smo 800 µL raztopine posameznega primarnega protitelesa, od tega smo 400 µL raztopine dodali v luknjico, kjer smo gojili celice v kontrolnem mediju, 400 µL raztopine pa v luknjice, kjer smo pričakovali diferenciacijo celic.

Vse skupaj smo čez noč inkubirali v hladilniku (4°C).

Naslednji dan smo pripravili raztopini sekundarnih protiteles raztopini PBS. Uporabili smo protitelesa proti mišjim protitelesom (za anti-Nestin, anti-MAP2 in anti-NF-200) in protitelesa proti kunčjim protitelesom (za anti-GFAP, anti-Doublecortin in anti-PSD-95). Oboja smo redčili v razmerju 1:500. Od tu naprej je postopek potekal v temi.

Celice smo prekrili s sekundarnimi protitelesi in jih 45 minut inkubirali na sobni temperaturi v temi. Nato smo sekundarna protitelesa odstranili in celice trikrat po 10 minut sprali s PBS. Pri barvanju EMC smo ob zadnjem spiranju v PBS dodali DAPI, kiobarva celična jedra (v razmerju 1:500).

Pobarvane celice smo opazovali in fotografirali z invertnim fluorescentnim mikroskopom, opremljenim s fotografsko kamero. (Zeiss observer Z1) pod 160× povečavo.

3.2.3 Kvantitativno določanje izražanja specifičnih genov

3.2.3.1 Izolacija RNA

3.2.3.1.1 Material

Seznam uporabljenih aparatur

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

Seznam uporabljenega potrošnega materiala

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

Seznam uporabljenih kemikalij

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

3.2.3.1.2 Priprava na izolacijo RNA

Med gojenjem EMC smo po dveh in treh tednih po indukciji diferenciacije v živčne celice kulture vzorčili za izolacijo RNA. To smo naredili tako, da smo iz parov luknjic, kjer je bila že pod svetlobnih mikroskopom opazna morfološka razlika med celicami v kontrolnem in diferenciacijskem mediju, s strgalom postrgali vzorce enoslojnih kultur in jih centrifugirali 5 minut pri $300 \times g$ na sobni temperaturi. Supernatant smo odlili in peletu dodali Trireagenta zadostuje za razkroj $5-10 \times 10^6$ celic). Pelet smo resuspendirali s ponavljajočim pipetiranjem, nato pa lizat celic prenesli v mikrocentrifugirke. Tako pripravljene vzorce smo hranili v zamrzovalniku (-80 °C) do nadaljnje analize.

Kulturo MMC iz kostnega mozga smo v primeru Protokola 1 vzorčili 3 tedne po indukciji diferenciacije, v primeru Protokola 2 pa 21 in 46 dni po indukciji diferenciacije.

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

3.2.3.1.3 Postopek izolacije RNA

Mikrocentrifugirke s celičnim lizatom in 0,5 ml Trireagenta, ki smo jih hranili v zamrzovalniku (-80 °C) smo odtajali, močno stresli na električnem stresalniku in jih pustili 5 minut na sobni temperaturi (tako smo zagotovili popolno disociacijo nukleoproteinskih kompleksov). Dodali smo 0,2 ml kloroforma na 1 ml uporabljenega Trireagenta. Vzorce smo tesno zaprli, jih stresali na električnem stresalniku 15 sekund, nato pa jih 3 minute pustili stati na sobni temperaturi. Sledilo je 15-minutno centrifugiranje pri $12000 \times g$ na 4

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

3.2.3.2 Reverzna transkripcija (prepis RNA v cDNA)

3.2.3.2.1 Material

Seznam uporabljenih laboratorijskih opreme

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

Seznam uporabljenega potrošnega materiala

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

Seznam uporabljenih kemikalij

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

3.2.3.2.2 Postopek prepisa RNA v cDNA

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

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

- 5 µl 10x pufra za obratno transkripcijo,
- 2 µl 25x dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP),
- 5 µl 10x naključnih začetnih oligonukleotidov,
- 2,5 µl encima MultiScribe,
- 2,5 µl RNA-znega inhibitorja (končna koncentracija 1U/µl),
- 1 µl RNA
- do 50 µl prečiščene vode z 0,1 % DEPC

Pred pipetiranjem smo reagente, razen encima, nakratko premešali na električnem stresalniku.

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

3.2.3.3 Analiza izražanja genov z verižno reakcijo pomnoževanja v realnem času

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

Pri metodi gre za pomnoževanje tarčne cDNA na katero se poleg začetnih oligonukleotidov veže še fluorescenčno označena sonda (Taqman sonda), ki se specifično prilega na zaporedje med obema začetnima oligonukleotidoma. Sonda je kratko zaporedje DNA, ki ima na 5- koncu vezano reportersko fluorescentno barvilo in na 3- koncu dušilec fluorescence, ki v nerazgrajeni sondi absorbira fluorescenco reporterskega barvila. Seveda obstajajo sonde z različnimi reporterskimi in dušilnimi barvili. V našem primeru smo uporabili sondi, ki ima kot reportersko barvilo vezan 6-karboksifluorescin (FAMTM) in kot dušilec 6-karboksi-tetrametil-rodamin (TAMRATM). Med pomnoževanjem DNA polimeraza s svojo ekszonukleazno aktivnostjo odcepi sondi in posledično se sprostita tudi obe barvili, ki sta sedaj ločeni, kar onemogoči dušenje emisijskega spektra, ki ga oddaja reportersko barvilo

(FAMTM). Fluorescensa med pomnoževanjem cDNA narašča in sicer sorazmerno s količino odcepljenih sond, ki pa je prav tako sorazmerna s količino nastalega produkta. Cikel, pri katerem fluorescensa (krivulja pomnoževanja cDNA) prvič preseže 10-kratnik standardne deviacije sevanja bazne linije imenujemo Ct ali mejni cikel (Cycle threshold). Le-ta je obratnosorazmerna začetni koncentraciji cDNA v vzorcu (Dieffenbach in Dveksler, 2003; Rapley in Harbron, 2004).

Preverjali smo izražanje genov za vimentin, GFAP, MAP2 in Musashi 1.

3.2.3.3.1 Material

Seznam uporabljene laboratorijske opreme

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

Seznam uporabljenega potrošnega materiala

- Folija za 1ep1jenje optične reakcijske ploščice (ABI Prism Optical Adhesive Covers) (Biosystems, ZDA)
- Aluminijasta folija
- Luknjičasto pokrivalo za optično reakcijsko ploščico
- Mikrocentrifugirke (Eppendorf, Nemčija)
- Optična reakcijska ploščica s 96 luknjicami (ABI Prism 96- Well Optical Reaction Plate) (Applied Biosystems, ZDA)
- Nastavki za pipete; 10, 100 in 1000 µl (Costar, ZDA)
- Stojalo za centrifugirke in mikrocentrifugirke

Seznam uporabljenih kemikalij

- Osnovna zmes - TaqMan[®] Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems, ZDA)
- Prečiščena voda (Ph. Eur. 4th; Zavod RS za transfuzijsko medicino)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen vimentin (TaqMan[®] Gene Expression Assays-Assays on DemandTM, Applied Biosystems, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen GFAP (TaqMan[®] Gene Expression Assays-Assays on DemandTM, Applied Biosystems, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen MAP2 (TaqMan[®] Gene Expression Assays-Assays on DemandTM, Applied Biosystems, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen Musashi1 (TaqMan[®] Gene Expression Assays-.Assays on DemandTM, Applied Biosystems, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen GADPH (Human GAPDH Endogenous Control, Applied Biosystems, ZDA)

3.2.3.3.2 Postopek verižne reakcije pomnoževanja v realnem času

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

V mikrocentrifugirkah smo posebej za vsak gen (Vimentin, GFAP, MAP-2, Musashi1 in GADPH, ki služi kot endogena kontrola) zmešali ustrezeno količino reagentov in pripravili reakcijsko mešanico, ki smo jo prenesli na led. Sonde in začetne oligonukleotide smo med pripravo reakcijske zmesi zaščitili pred svetlobo s pomočjo aluminijске folije. Sestava reakcijske mešanice za 1 vzorec (20 µl):

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

V optično ploščico s 96-imi luknjicami smo odpipetirali po 20 µl mešanice, nato pa dodali še 5 µl vzorca. Kot negativno kontrolo mešanice za posamezne gene smo v luknjice namesto cDNA dodali po 5 µl prečiščene vode. Optično ploščico smo zalepili s samolepilno folijo in jo centrifugirali 2 minuti pri 1000 x g na sobni temperaturi. Potem smo jo prekrili z luknjičastim pokrivalom in vstavili v aparat ABI Prism 7900HT. V računalniškem programu SDS 2.1 smo izbrali sonde, volumen reakcije in število ciklov. Proces verižne reakcije pomnoževanja je potekal v treh fazah: 2 minuti pri 50 °C, 10 minut pri 95 °C in 40 ciklov pomnoževanja, ki so bili sestavljeni iz 15-ih sekund pri 95 °C in 1 minute pri 60 °C.

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

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

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

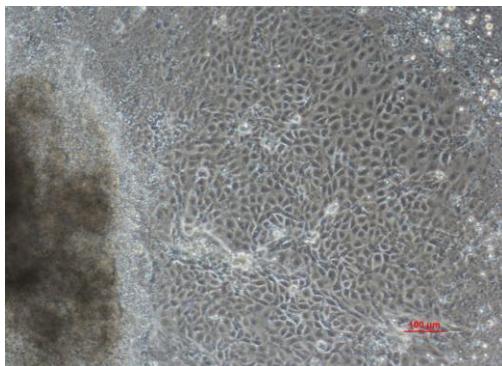
4 REZULTATI

4.1 IDENTIFIKACIJA ŽIVČNIH CELIC, DIFERENCIRANIH *IN VITRO* IZ EMC

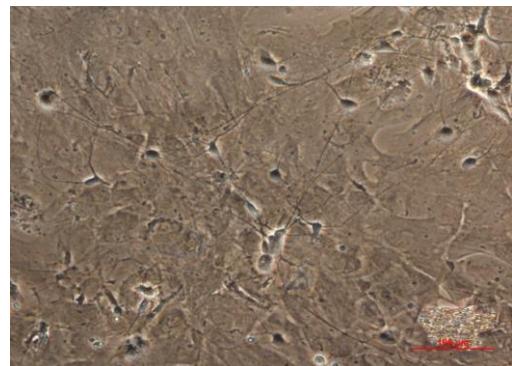
4.1.1 Opazovanje morfologije celic

Že 2-3 dni po indukciji diferenciacije so bile s svetlobnim mikroskopom (Nikon Eclipse TE300, Japonska) opazne morfološke razlike med celicami, gojenimi v kontrolnem in celicami, gojenimi v diferenciacijskem mediju. EMC, gojene v kontrolnem mediju, so ves čas poskusa (3 tedne) kazale nediferencirano morfologijo, ves čas so ohranjale približno enako, okroglo ali ovalno obliko, bile so relativno majhne, premera okrog 7-10 μm . Med celicami, gojenimi v diferenciacijskem mediju, pa smo opazili celice, ki so dobivale obliko, značilno za živčne celice, postajale so torej večje, bolj in bolj podolgovate, razvejane, z izrazitim delom celice, ki je spominjal na somo živčne celice, od koder so segali številni izrastki. Pri nekaterih celicah smo opazili tudi medsebojne povezave med temi izrastki in sicer z bolj odebelenimi deli izrastkov, kar bi lahko predstavljalo živčno sinapso.

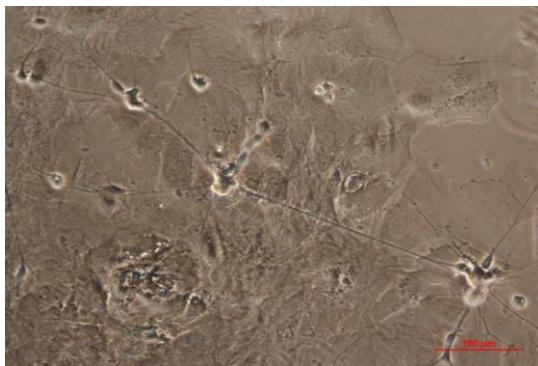
Slike 10-14 prikazujejo morfologijo EMC po različnem času in v različnih medijih za gojenje in diferenciacijo. Slike 10 – 12 prikazujejo morfologijo celic, ki spominja na živčne celice, vidni si dolgi celični izrastki in povezave med celicami. Na sliki 10 so še nediferencirane celice, na sliki 13 pa celice, gojene v mediju, ki ne povzroča diferenciacije celic.



Slika 10: EMC v kontrolnem mediju, 1 dan po začetku diferenciacije (100 \times povečava)



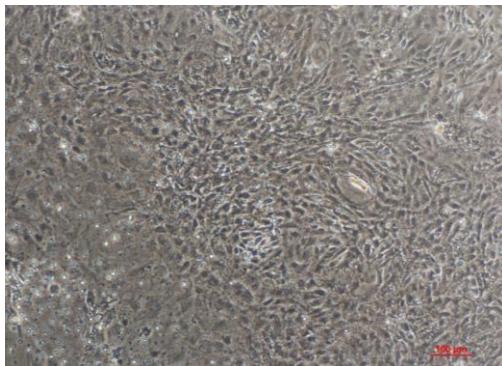
Slika 11: EMC 14 dni po indukciji diferenciacije (200 \times povečava)



Slika 12: EMC 14 dni po začetku diferenciacije
(200× povečava)



Slika 13: EMC 22 dni po začetku diferenciacije
(100× povečava)



Slika 14: EMC v kontrolnem mediju, 20 dni po začetku diferenciacije (povečava 100×)

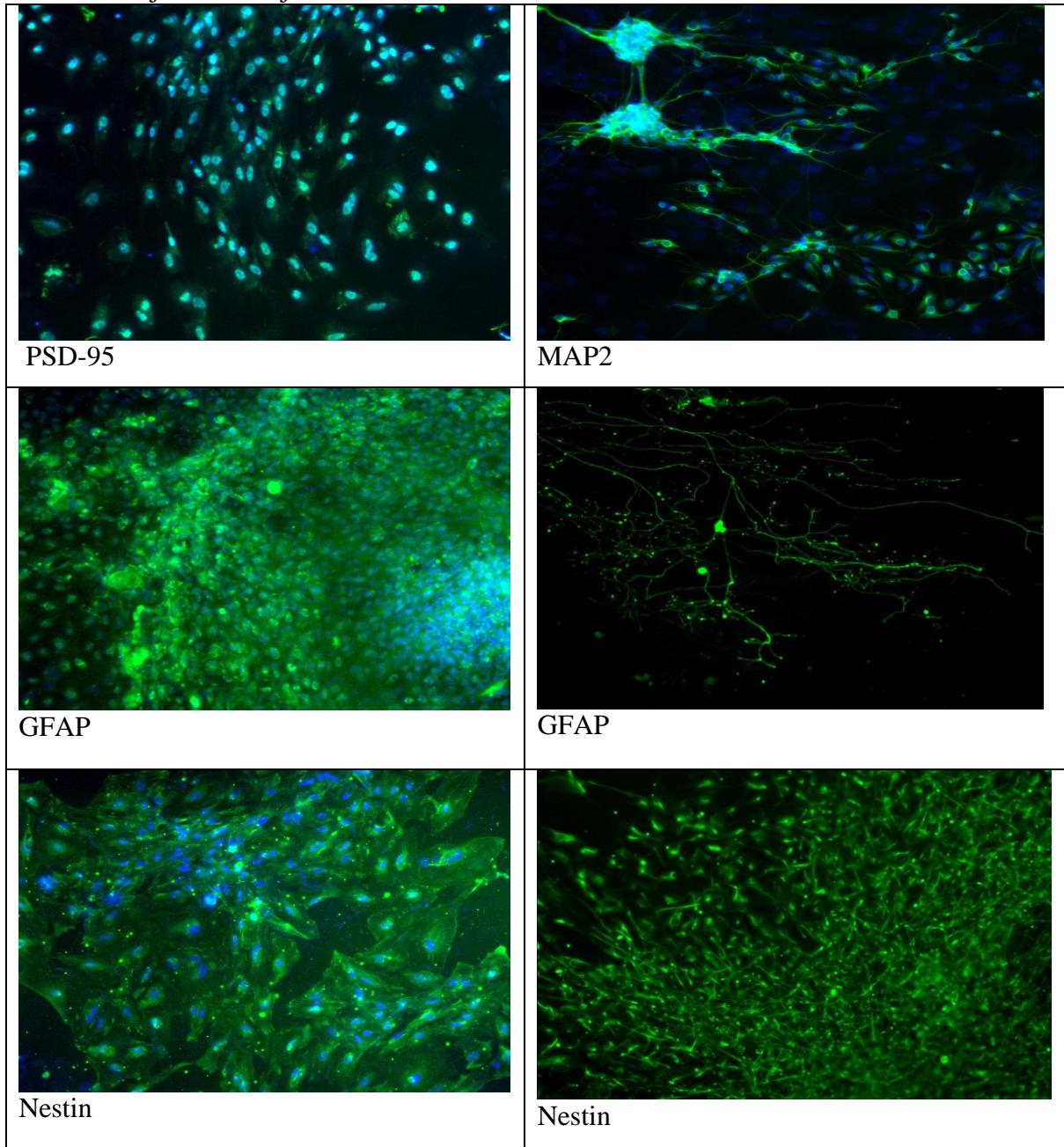
4.1.2 Imunofluorescentno barvanje

Kulture smo opazovali in fotografirali z invertnim fluorescentnim mikroskopom, opremljenim s fotografsko kamero in sistemom za analizo slik. (Zeiss observer Z1) pod 160× povečavo.

Celice, gojene v diferenciacijskem mediju, so izražale celične označevalce živčnih celic (Nestin, GFAP, MAP2, Doublecortin, NF-200, PSD-95). Celice, gojene v kontrolnem mediju, so bile ze te označevalce negativne.

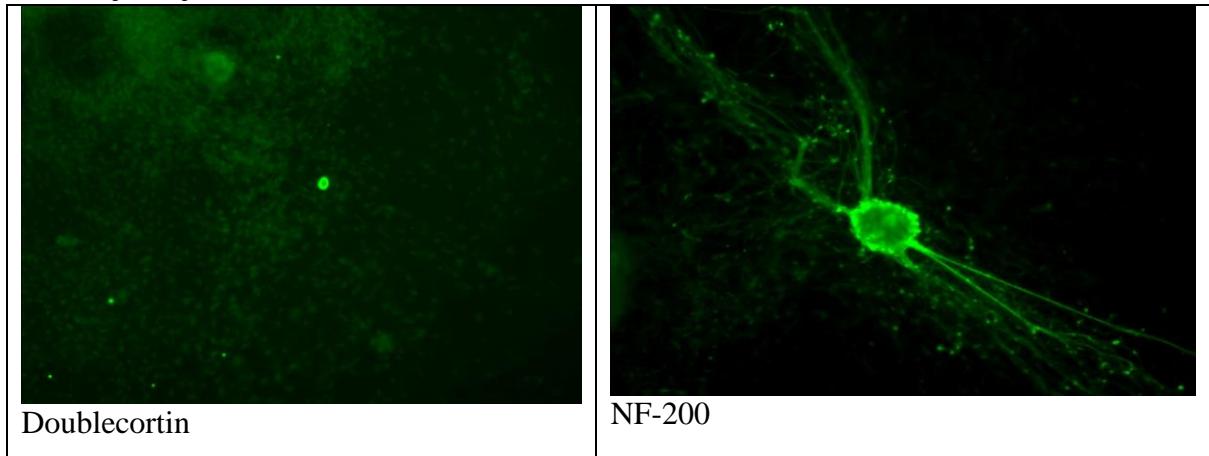
Preglednica 8 prikazuje izražanje označevalcev živčnih celic v kulturi EMC, gojeni v diferenciacijskem mediju

Preglednica 8: Izražanje označevalcev živčnih celic pri kulturi EMC, gojeni v diferenciacijskem mediju



se nadaljuje...

...nadaljevanje

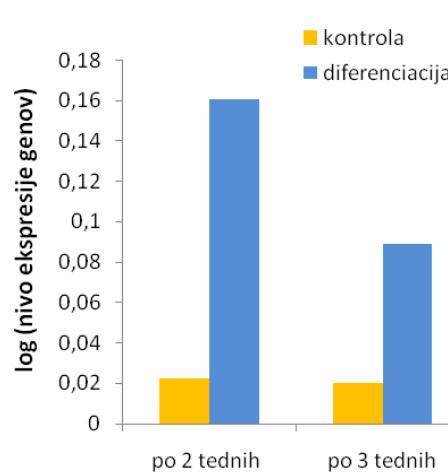


4.1.3 Kvantitativna analiza izražanja specifičnih genov

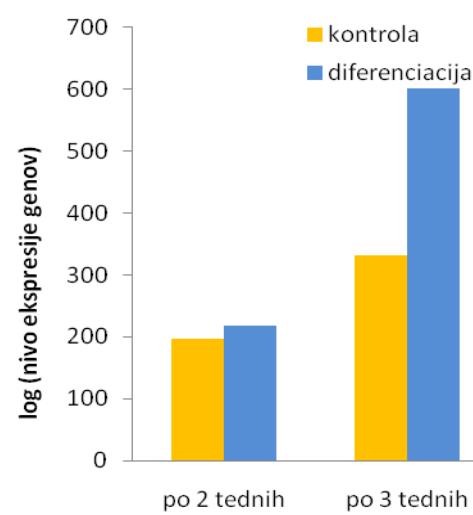
Analiza izražanja specifičnih genov je poleg morfologije in imunoflourescentnega barvanja dokaz uspešne *in vitro* diferenciacije EMC v živčne celice. Zanimalo nas je, kako so izraženi geni, ki kodirajo celične elemente značilne za živčne celice v kulturah, gojenih v kontrolnem ter v diferenciacijskem mediju. Ovrednotili smo izražanje genov za vimentin, GFAP, MAP-2 ter musashi.

Rezultate izražanja genov EMC smo normalizirali glede na izražanje gena GAPDH. Hišni gen (angl.: housekeeping gene) GAPDH je konstitutivni gen, ki se prepisuje relativno konstantno v mnogih ali vseh znanih pogojih. Njegovi produkti so pomembni za vzdrževanje delovanja celice (glikolizo, transkripcijo, znotrajcelični transport, apoptozo). Predvideva se, da eksperimentalni pogoji ne vplivajo na njegovo izražanje (Shashidharan in sod., 1999).

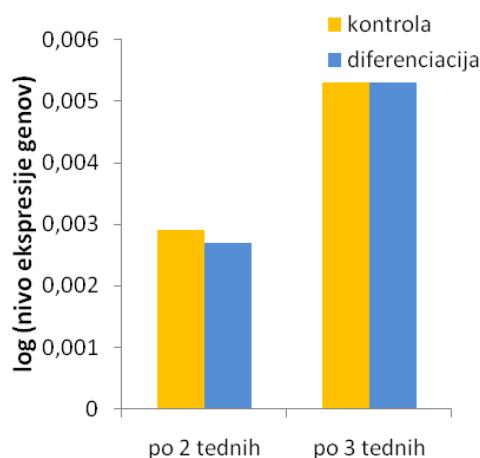
Slike 15 – 18 prikazujejo izražanje specifičnih genov pri EMC, gojenih v kontrolnem in diferenciacijskem mediju po 2 in po 3 tednih.



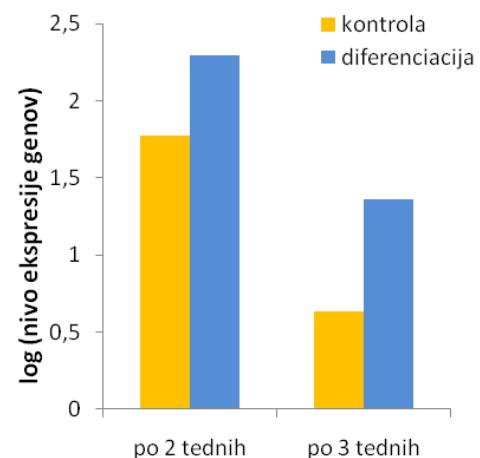
Slika 15: Relativno izražanje gena vimentin glede na hišni gen GAPDH



Slika 16: Relativno izražanje gena MAP2 glede na hišni gen GAPDH



Slika 17: relativno izražanje gena GFAP glede na hišni gen GAPDH



Slika 18: relativno izražanje gena Musashi 1 glede na hišni gen GAPDH

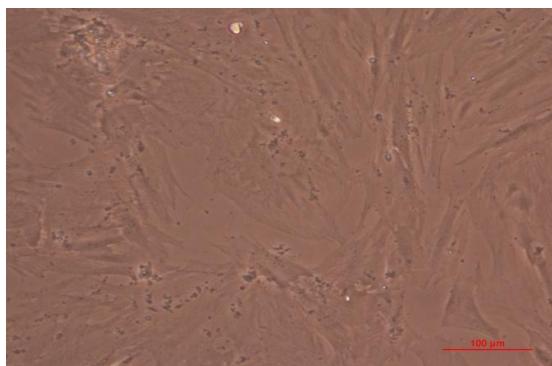
4.2 IDENTIFIKACIJA ŽIVČNIH CELIC, DIFERENCIRANIH *IN VITRO* IZ MMC

4.2.1 Opazovanje morfologije celic

4.2.1.1 Opazovanje morfologije celic, diferenciranih po Protokolu 1

MMC iz (KM13), diferencirane po protokolu, ki smo ga uporabili tudi za diferenciacijo EMC, niso kazale posebnih razlik med kulturo v kontrolnem ter kulturo v diferenciacijskih medijih. Vseeno so bile v domnevno diferenciranih celicah opazne posamezne celice, ki so kazale bolj razvejano morfologijo, za katero pa bi pravzaprav težko trdili, da je spominjala na obliko živčnih celic.

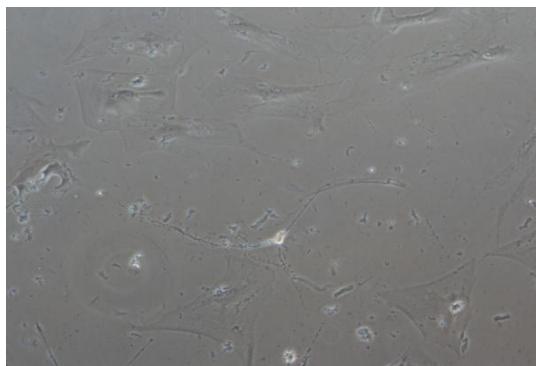
Slike 19 – 22 prikazujejo morfologijo MMC, diferenciranih po protokolu 1, po različnem času in v različnih medijih za gojenje in diferenciacijo:



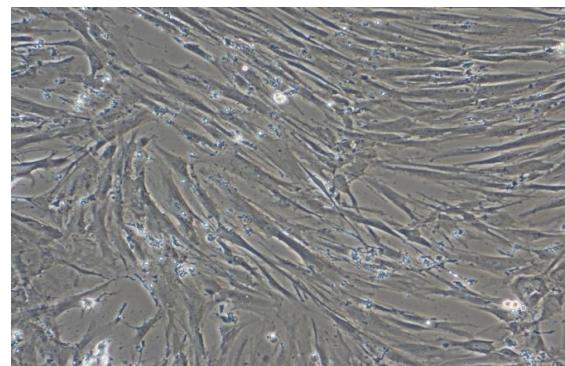
Slika 19: MMC, 14 dni po začetku diferenciacije v kontrolni mediju (200× povečava)



Slika 20: MMC, 14 dni po začetku diferenciacije v nevromediju 1 (200× povečava)



Slika 21: MMC, 22 dni po začetku diferenciacije v nevromediju 2 (100× povečava)



Slika 22: MMC, 22 dni po začetku diferenciacije v kontrolnem mediju (100× povečava)

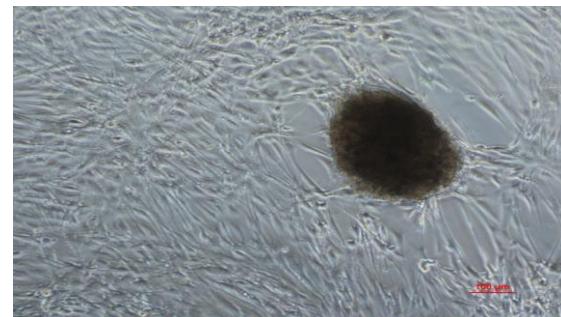
4.2.1.2 Opazovanje morfologije celic, diferenciranih po Protokolu 2

Pri MMC (KM8) smo opazili morfološke razlike med kulturo v kontrolnem mediju ter kulturo, gojeno v medijih za diferenciacijo. V kontroli so celice kazale tipično vretenasto obliko mezenhimskih celic. V diferenciacijskem mediju pa so celice že po dveh dneh oblikovale strukture, ki so na videz spominjale na nevrosfere (Slika 24). Take strukture smo v kulturi opažali še približno mesec dni po začetku diferenciacije. Nato smo med domnevno diferenciranimi celicami opazili tudi redke celice z izrazito drugačno morfologijo, ki je spominjala na živčne celice (Slika 27). Take celice so bile namreč močno razvejane, vendar pa niso bile bistveno večje od ostalih celic, predvsem pa jih je bilo glede na ostale celice veliko manj kot pri diferenciranih EMC.

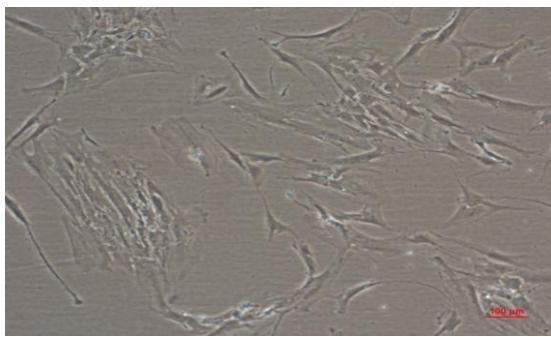
Slike 23 – 28 prikazujejo morfologijo MMC, diferenciranih po protokolu 2, po različnem času in v različnih medijih za gojenje in diferenciacijo.



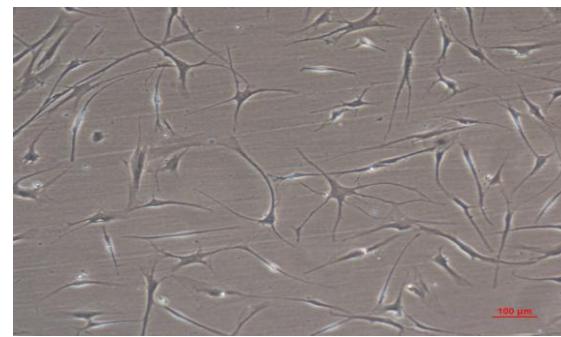
Slika 23: MMC, 2 dni po začetku diferenciacije v kontrolnem mediju (100× povečava)



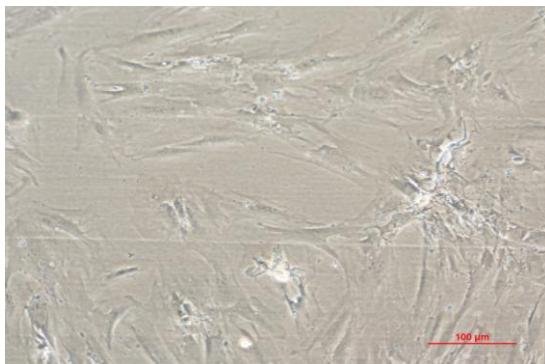
Slika 24: MMC, 2 dni po začetku diferenciacije v mediju za tvorbo nevrosfer (100× povečava)



Slika 25: MMC, 12 dni po začetku diferenciacije v kontrolnem mediju (100× povečava)



Slika 26: MMC, 12 dni po začetku diferenciacije v kontrolnem mediju (100× povečava)



Slika 27: MMC, 32 dni po začetku diferenciacije v kontrolnem mediju (100× povečava)



Slika 28: MMC, 32 dni po začetku diferenciacije v nevromediju (100× povečava)

4.2.2 Imunofluorescentno barvanje

Z imunofluorescentnim barvanjem celic, diferenciranih tako po Protokolu 1 kot po Protokolu 2, nismo dobili pozitivnih rezultatov. Obarvale se niso niti celice kontrolnega niti celice diferenciacijskega medija.

4.2.3 Kvantitativna analiza izražanja specifičnih genov

Tudi pri diferenciaciji MMC po Protokolu 1 in po Protokolu 2 smo preverili izražanje genov za vimentin, GFAP, MAP-2 ter Musashi 1. V skladu z opazovanjem morfologije in imunofluorescentnim barvanjem nam tudi kvantitativna analiza izražanja teh genov ni potrdila uspešne diferenciacije MMC v živčne celice.

5 RAZPRAVA

5.1 DIFERENCIACIJA EMC V ŽIVČNE CELICE *IN VITRO*

Človeške EMC so pluripotentne celice, ki jih lahko dolgo gojimo *in vitro* in predstavljajo vir prekurzorskih celic za diferenciacijo v katerikoli celični tip za raziskave človekovega razvoja in zdravljenje mnogih bolezni. Pridobivanje in raziskave živčnih prekurzorjev iz EMC zato nudijo vpogled v razvoj živčnega sistema in so osnova za razvoj celičnih terapij za zdravljenje mnogih živčnih in degenerativnih bolezni (Erceg in sod., 2008).

Diferenciacijo kulture EMC v živčne celice smo ovrednotili na tri načine: morfološko, z imunofluorescentnim barvanjem bolj ali manj specifičnih označevalcev in s kvantitativno analizo izražanja specifičnih genov.

Pri opazovanju morfologije s svetlobnim mikroskopom smo ugotovili bistvene razlike med kulturo, gojeno v kontrolnem in kulturo, gojeno v diferenciacijskem mediju. Pri slednji smo namreč opazili številne celice z značilno morfologijo živčnih celic, videti je bilo dele celic, ki so spominjali na somo živčne celice, iz nje pa so segali krajsi in daljši izrastki. Med daljšimi izrastki sosednjih celic so bile vidne tudi odebujene povezovalne strukture, ki so močno spominjale na obliko sinapse. V kontrolni kulturi takih celic nismo opazili, tam so celice ohranjale bolj nediferencirano obliko, bile so manjše ter okrogle ali ovalne oblike (slike 10-14).

Z imunofluorescentnim barvanjem smo dokazali prisotnost vseh testiranih označevalcev (Nestin, GFAP, MAP-2, PSD-95, Doublecortin, NF-200). Pozitivno barvanje nestina nam je potrdilo, da so bile v kulturi živčne progenitorske celice. Znano je, da se nestin kot element citoskeleta pojavlja v začetku embrionalnega razvoja živčnih celic, kasneje ga nadomestijo drugi, sorodni filamenti. Kljub temu, da nestin zasledimo tudi pri drugih telesnih celicah (testisev, očesa, skeletne mišice, srčne mišice, trebušne slinavke), je pri živčnih progenitorskih celicah tako obilno zastopan, da ga lahko v kombinaciji z drugimi označevalci uporabimo kot zanesljiv dokaz prisotnosti živčnih progenitorskih celic (Roybon in sod., 2006).

Dokaz, da smo imeli v kulturi razvijajoče se nevrone, je bilo tudi pozitivno barvanje označevalca MAP2, ki sodeluje pri povezovanju citoskeletalnih elementov in rasti celic med nevrogenezo.

Pozitivno barvanje citoskeletalnega elementa GFAP kaže na zastopanost astrocitov v naši kulturi.

Potrdili smo tudi izražanje označevalca NF-200, ki je intermediarni filament, značilen za zrele nevrone. Sodeluje namreč pri dinamičnih lastnostih aksonskoga citoskeleta, na primer pri rasti in transportu vzdolž aksona (Kesavapany in sod., 2007).

Doublecortin je z mikrotubuli povezan protein, ki se močno izraža med embrionalnim razvojem možganov. Tudi ta označevalec se je sicer slabše, a še vedno pozitivnoobarval.

S prisotnostjo različnih označevalcev smo tako pokazali, da so bile v naši kulturi istočasno prisotne zrele in razvijajoče se živčne celice.

V skladu z opazovanjem celične morfologije s svetlobnim mikroskopom, smo s pozitivnim barvanjem označevalca PSD-95 potrdili tudi prisotnost sinaps. Ta označevalc je namreč povezan z delovanjem receptorjev in citoskeletnih elementov v postsinaptični membrani (El-Husseini in sod., 2000) (Preglednica 10).

Tudi kvantitativna analiza specifičnih genov je potrdila uspešno diferenciacijo EMC v živčne celice. Izražanje gena MAP2 je bilo že po dveh, še bolj pa po treh tednih gojenja, večje pri diferenciranih celicah kot pri kontroli (Slika 16). Podobno, vendar s še večjo razliko, je bilo z izražanjem gena za vimentin, ki pa po navedbah nekaterih avtorjev niti ni merodajan označevalc živčnih celic, saj je široko zastopan tudi v drugih tkivih izven ektodermalne linije (Roybon in sod., 2006) (Slika 15). Tudi izražanje gena Musashi 1 je bilo večje pri diferenciranih celicah, kar je dodaten dokaz prisotnosti zgodnjih živčnih progenitorjev (Slika 18). Ni pa bilo bistvene razlike v izražanju gena za GFAP, kar bi verjetno lahko razložili s tem, da gre za protein, značilen za že zrele glia celice, ki se morda še ni začel v celoti izražati. Opaziti je bilo namreč razliko med izražanjem gena po 2 tednih in po 3 tednih, verjetno je, da bi se ta razlika z nadaljnim gojenjem v kulturi še povečala na račun večjega izražanja gena pri diferenciranih celicah (Slika 17).

5.2 DIFERENCIACIJA MMC IZ KM V ŽIVČNE CELICE *IN VITRO*

Odrasli kostni mozeg vsebuje heterogeno populacijo celic, ki se v grobem deli na mezodermalne stromalne celice KM in krvotvorne MC. Stomalne celice lahko z deplecijo ali selektivnim pritrjanjem na plastično podlago izoliramo iz KM in jih gojimo *in vitro* kot celično kulturo. Take kulture vsebujejo multipotentne mezenhimske MC (MMC), ki se lahko diferencirajo v različna mezodermalna tkiva, na primer v kost, hrustanec, maščobno tkivo, mišično tkivo in fibroblaste. Čeprav so odrasle MC linijsko omejene, je vedno več dokazov, da lahko te celice oziroma vsaj njihova subpopulacija, prestopijo meje svoje zarodne plasti in se diferencirajo v celice druge zarodne plasti, na primer v nevroektoderm. Ta fenomen imenujemo transdiferenciacija in je del plastičnosti MC. Še vedno ni jasno, ali gre v takih primerih za resnično nevroektodermalno diferenciacijo ali pa je le-ta posledica celične fuzije oziroma nespecifičnosti označevalcev, s katerimi jo dokazujemo (Hermann in sod., 2006; Croft in Przyborski, 2006).

Objavljenih je bilo sicer že kar nekaj raziskav, ki so pokazale uspešno *in vitro* diferenciacijo MMC v nevroektodermalne celice (Herman in sod., 2006). Vendar pa so pri večini raziskav manjkale analize označevalcev, značilnih za živčne celice pri izhodiščni populaciji celic in kvantitativne analize izražanja med samo diferenciacijo. Prav zato je celoten koncept transdiferenciacije še vedno nekoliko sporen.

Pri našem poskusu nismo dokazali diferenciacije MMC iz KM v živčne celice pri nobenem od uporabljenih protokolov. Imunofluorescentno barvanje ni dalo pozitivnih rezultatov za nobenega od označevalcev (Nestin, MAP2, GFAP, Doublecortin, NF-200, PSD-95) niti pri celicah, gojenih v kontrolnem mediju niti pri celicah, gojenih v medijih za diferenciacijo.

Neuspelo diferenciacijo bi lahko razložili s tem, da smo kot izhodiščno kulturo uporabili že precej bolj diferencirane celice (kot na primer EMC), pri katerih bi transdiferenciacija potekla manj verjetno.

Poleg tega tudi nismo fenotipsko karakterizirali izhodiščne kulture, karakterizacijo MMC smo izvedli le skozi izolacijo s fikolom, prilepljanjem celic na plastično podlago in gojenjem v mediju MSCGM, ki favorizira namnoževanje MMC. Celice pa bi bilo smiselno izolirati s celičnim ali magnetnim ločevalcem, da bi dobili bolj čisto kulturo.

Ne gre pa tudi zanemariti dejstva, da je bil KM, odvzet pri bolnikih pri relativno visoki starosti, pri katerih ne pričakujemo visoko zastopane populacije MC, saj njena velikost s starostjo pada. KM je bil odvzet pri rutinskem diagnostičnem postopku na Hematološki kliniki ljubljanskega Kliničnega centra, pri katerem gre najpogosteje za ugotavljanje raznih krvnih bolezni in tudi to dejstvo ne govori v prid visoki zastopanosti populacije MC pri teh osebah.

Opazili smo morfološke razlike med celicami, gojenimi v kontrolnem in v diferenciacijskem mediju. Pri diferenciacijskem mediju smo opazili celice, ki so na videz spominjale na značilno morfologijo živčnih celic. Vendar pa bi te celice težko karakterizirali kot diferencirane v nevroektodermalne, sploh glede na negativno izražanje označevalcev. Znano je tudi, da je lahko celična morfologija, ki spominja na živčne celice, posledica celičnega krčenja kot odgovora na stres, ki so ga lahko povzročale sestavine medijev. Spremembe celične arhitekture so posledica prepisovanja genov. Geni, ki so udeleženi v preoblikovanju tkiva so na primer tesno povezani z dinamičnimi spremembami celične morfologije, ki jih inducirata stres in fiziološki procesi spremenjanja oblike. To kaže na direktno vpletjenost citoskeleta v celičnem sporočilnem aparatu. Od tod sledi, da lahko tarčna reorganizacija citoskeleta aktivira prepisovanje genov, ki uravnava celično obliko (Hermann in sod., 2006; Croft in Przyborski, 2006).

5.3 PRIHODNJE DELO

Nadgradnja našega dela bo ponovitev enakih poskusov v čimvečjem številu, kar nam bo dalo tudi statistično bolj merodajno sliko o dokazih *in vitro* diferenciacije v živčne celice. Smiselno bi bilo tudi poskusiti z drugačnimi protokoli.

Kot na dlani pa se zdi tudi nadaljnji dokaz uspešne diferenciacije v živčne celice in sicer z elektrofiziološkim preizkusom funkcionalnosti diferenciranih celic.

Klinični poskusi transplantacij MC za zdravljenje živčnih poškodb in bolezni odpirajo številna nova vprašanja. Najprej se pojavi vprašanje o varnosti. Najpomembnejše potencialno tveganje pri transplantacijah MC, še posebej EMC, predstavlja tveganje tvorbe tumorjev. Že po definiciji so EMC po transplantaciji sposobne tvorbe teratomov. Celice za transplantacijo bi torej morale biti že linijsko usmerjene. In tudi dejansko pri poskusih presaditev živčnih prekurzorjev, pridobljenih iz linij EMC, celice niso tvorile teratomov.

Druga potencialna težava pri transplantacijah alogenih EMC je verjetnost zavrnitve presadka, te težave sicer ni pri presajanju avtolognih MC iz odraslih tkiv, na primer iz KM, vendar pa se tu pojavi nova, zaenkrat še ne rešena, težava, kako dobiti enotno čisto populacijo MC iz že odraslih tkiv (Ben-Hur, 2006; Baharvand in sod., 2007).

Preden bodo terapije z MC dejansko uporabljene pri pacientih, se bomo morali naučiti natančno kontrolirati proliferacijo, genetske modifikacije in diferenciacijo MC v specifične celične tipe in s tem preprečiti tvorbo tumorjev. Naučiti se bomo morali tudi vzpostaviti učinkovito funkcijsko integracijo živčnih celic v mrežo sinaps in nevronov.

Pred kliničnimi poskusi na človeku bi bilo smiselno preveriti učinkovitost teh terapij na živalskih modelih, ki bi posnemale človeške bolezni. Ti modeli nam predstavijo tveganja in prednosti celičnih terapij, čeprav ne moremo čisto direktno prenesti podatkov pridobljenih pri živalih na zdravljenje človeka. Živalske vrste se namreč razlikujejo po stopnji nevronske plastičnosti in po bolezenskih mehanizmih (Lindvall in sod., 2004; Lindval in Kokaia, 2006).

Za klinične poskuse, ki predvidevajo uporabo matičnih celic za zdravljenje nevroloških motenj, je torej še prezgodaj, vendar pa hiter napredek na tem področju daje upanje, da bodo celične terapije z MC omogočile zdravljenje bolezni kot so Parkinsonova bolezen, Alzheimerjeva bolezen, posledice možganske kapi, Huntingtonova bolezen, amiotrofna lateralna skleroza, multupla skleroza in lezije hrbtenjače.

Ne glede na to, kako razburljivo je raziskovanje MC in nevrobioloških mehanizmov, bo šele klinična uporaba MC pokazala njihovo dejansko vrednost. Vseeno pa se prvič pojavlja resnično upanje, da bomo enkrat v prihodnosti lahko pomagali osebam s trenutno neobvladljivimi nevrodegenerativnimi boleznimi.

Za širši pogled na tkivno inženirstvo in celične terapije je vsekakor ključno interdisciplinarno sodelovanje. Vprašati se moramo, zakaj je nek organizem (človek) tak kot je? Zakaj so nekatere živali, na primer pupek ali aksolotl, sposobne regeneracije tako kompleksnih organov kot so okočnine, rep, očesna mrežnica ter leča in celo deli srca, druge pa ne? (Brockes in sod., 2001) Organizma se ne da popolnoma razumeti brez poznavanja njegove biološke preteklosti. Za širšo obravnavo regeneracije tkiv je torej ključnega pomena tudi filogenetski oziroma evolucijski pristop, ki zahteva razmišljanje izven človekove želje po lastni dobrobiti in se vrača na zame eno najlepših in najpomembnejših misli: Nič v biologiji nima smisla, razen v luči evolucije (Dobzhansky, 1964).

6 POVZETEK

Regeneracija je fiziološki proces, pri katerem se nadomestijo izgubljeni ali poškodovani telesni deli. Pri učinkovitem celjenju ran in poškodb pomembno sodeluje specializirana skupina celic – matične celice (MC), ki jih v sebi ohranimo celo življenje. MC so zelo redke, sposobne so dolgotrajnega asimetričnega deljenja in tvorbe sebi identičnih kopij ter diferenciacije v bolj usmerjene tkvine celice. Pomembna lastnost MC je plastičnost – sposobnost odraslih MC, da se diferencirajo tudi v celice drugih tkiv in ne samo v celice tkiva iz katerega izhajajo.

Embrionalne matične celice (EMC) so celice, ki izvirajo iz zgodnjega zarodka, to je pri človeku 5 do 7 dni po oploditvi in se jih v kulturi *in vitro* lahko vzdržuje neomejeno dolgo. EMC se teoretično lahko razvijejo v katerokoli tkivo organizma. Imajo torej zelo visoko potentnost, so pluripotentne. Ker je izolacija humanih EMC (hEMC) iz zarodkov etično sporna, se znanost nagiba k raziskavam drugih, lažje dostopnih tipov MC, na primer mezenhimskeih MC (MMC) iz kostnega mozga (KM). MMC so multipotentne in se lahko *in vitro* diferencirajo v celice mezodermalne linije (osteoblaste, hondrocite, adipocite, mišične celice). Raziskave kažejo, da se pod določenimi eksperimentalnimi pogoji lahko diferencirajo tudi v celice drugih linij, na primer v živčne celice, torej v ektodermalno linijo, kar kaže na njihovo plastičnost.

Namen našega dela je bil izdelati ustrezni protokol za diferenciacijo EMC in MMC v živčne celice ter s tem dokazati potentnost oziroma plastičnost teh celic. Izdelava takega protokola pa bi lahko služila namenom regenerativne medicine in znotraj nje nevrologiji, ki vključuje raziskave in zdravljenje mnogih nevrodegenerativnih bolezni, na primer Parkinsonove bolezni, Alzheimerjeve bolezni, Huntingtonove bolezni, amiotrofne lateralne skleroze, multiple skleroze, poškodb hrbtnače in posledic kapi.

Uspešnost umetne diferenciacije EMC in MMC v živčne celice smo preverili na tri načine. Ves čas poskusa smo pod mikroskopom opazovali in fotografirali morfološke spremembe celic v kulturi. Diferenciacijo smo z uporabo invertnega fluorescentnega mikroskopa kvalitativno ovrednotili z imunofluorescentnim barvanjem s specifičnimi označevalci. Izražanje specifičnih genov pa smo kvantitativno ovrednotili z verižno reakcijo pomnoževanja v realnem času (TaqMan® PCR).

Uspešno umetno diferenciacijo EMC v živčne celice smo potrdili na vse tri načine, medtem ko je bila umetna diferenciacija MMC neuspešna. Pri slednji smo poskusili z enakim protokolom kot smo ga uporabili za umetno diferenciacijo EMC in nato še s protokolom, namenjenem diferenciaciji odraslih MC, vendar pa ne kvalitativno ne kvantitativno nismo dokazali prisotnosti živčnih celic v kulturi.

Umetna diferenciacija MC v živčne celice prispeva k razvoju regenerativne medicine, saj predstavlja enega izmed prvih korakov za doseg učinkovitega zdravljenja trenutno neobvladljivih nevrodegenerativnih bolezni. Preden bi umetno diferencirane MC uporabili v predkliničnih in kliničnih študijah, se bomo morali naučiti natančno kontrolirati proliferacijo, genetske modifikacije in diferenciacijo MC v druge specifične celične tipe ter s tem preprečiti na primer tvorbo tumorjev, kar pri presaditvah MC zaenkrat predstavlja veliko nevarnost. Šele klinična uporaba MC pokazala bo torej pokazala njihovo dejansko

vrednost. Vseeno pa se prvič pojavlja resnično upanje, da bomo enkrat v prihodnosti lahko pomagali osebam s trenutno neobvladljivimi nevrodgenerativnimi boleznimi.

7 VIRI

- Alonso L., Fuchs E., 2003. Stem cells of the skin epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 1:11830-11835
- Altman J., Das G. D. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The journal of comparative neurology* 124, 319–335
- Andrews P., Matin M., Bahrami A., Damjanov I., Gokhale P., Draper J. 2005. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochemical Society Transactions*, 33: 1526-30
- Asakura A., Rudnicki M.A., Komaki M. 2001. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic and adipogenic differentiation. *Differentiation*, 68, 4-5: 245-253
- Ben-Hur Tamir. 2006. Human Embryonic Stem Cells for Neuronal Repair. *IMAJ*, 8: 122-126
- Baharvand H., Mehrjadi N-Z., Hatami M., Kiani S., Rao M., Haghghi M-M. 2007. Neural Differentiation from Human Embryonic Stem Cells in a Defined Adherent Culture Condition. *International Journal of Developmental Biology*, 51: 371-378
- Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey PG. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19 : 180 – 92
- Binder D.K. in Scharfman H.E. 2004. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth factors* 22, 3: 123-131
- Böcker W., Moll R., Poremba C., Holland R., van Diest P.J., Dervan P., Bürger H., Wai D., Diallo R.I., Brandt B., Herbst H., Schmidt A., Lerch M.M., Buchwallow I.B. 2002. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new biological concept. *Laboratory investigation*, 82: 737-746
- Bongso A., Richards M. 2004. History and perspective of stem cell research. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 18, 6: 827 - 842
- Brockes J.P. 1997. Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science*, 276: 81 – 87
- Carpenter G. In Cohen S. 1990. Epidermal growth factor. *The journal of Biological Chemistry*, 265, 14: 7709-7712
- Chenn A., McConnell S.K. 1995. Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell*, 82 : 631 – 41 .

Chung Y., Klimanskaya I., Becker S., Li T., Maserati M., Lu S-J, Zdravkovic T., Illic D., Genbacev O., Fisher S., Krtolica A., Lanza R. 2008. Human Embryonic Stem Cell Lines Generated without Embryo Destruction. *Cell Stem Cell* 2: 113-117

Coles B.L.K., Angénieux B., Inoue T., Del Rio-Tsonis K., Spence J.R., McInnes R.R., Arsenijevic Y., van der Kooy D. 2004. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 44: 15772-15777

Croft A.P., Przyborski S.A. 2006. Formation of Neurons by Non-Neural Adult Stem Cells: Potential Mechanism Implicates an Artifact of Growth in Culture. *Stem Cells*, 24: 1841-1851

DeLisa J. in Stolov W.C. 1981. Significant Body Systems. V: *Handbook of Severe Disability*. Walter C. Stolov in Michael R. Clowers.(ur.) US Department of Education, Rehabilitation Services Administration, 19-30

De Rooij D.G. 2003. Stem cells in the testis. *International Journal of Experimental Pathology*, 79, 2: 67-80

Dezawa M., Kanno H., Hoshino M. in sod. 2004. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation . *Journal of Clinical Investigation*, 113 : 1701 – 10

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

Dobzhansky T. 1964. Biology, Molecular and Organismic. *American Zoologist*, 4, 4: 443-452

Dominici M., Le BK., Mueller I. in sod. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy*, 8 : 315 – 7

Dupin E., Calloni G., Real C., Goncalves-Trentin A., Le Douarin N.M. 2007. Neural crest progenitors and stem cells. *Comptes Rendus Biologies* 330 : 521 – 9

El-Husseini A.E-D., Schnell E., Chetkovich D.M., Nicoll R.A., Bredt D.S. 2000. PSD-95 Involvement in Maturation of Excitatory Synapses. *Science*, 290, 5495: 1364 – 1368

Eng L.F., Ghirnikar R.S., Lee Y.L. 2000. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP – Thirty-One Years (1969-2000). *Neurochemical Research*, 25, 9/10: 1439-1451

Erceg S., Laínez S., Ronaghi M., Stojkovic P., Amparo Pérez-Aragó M., Moreno-Manzano V., Moreno-Palanques R., Planells-Cases R., Stojkovic M. 2008. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Regional Specific Neural Precursors in Chemically Defined Medium Conditions. *Plos One*, 3, 5, 2122

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

Evans M., Kaufman M., 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 5819: 154-6

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

Fiore M., Chaldakov G.N., Aloe L. 2009. Nerve growth factor as a signalling molecule for nerve cells and also for the neuroendocrine-immune systems. *Reviews in the neurosciences*, 20, 2: 133-145

Foster L.J., Zeemann P.A., Li C., Mann M., Jensen O.N., Kassem M. 2005. Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation. *Stem Cells*, 23 : 1367 – 77

Francis F., Koulakoff A., Boucher D., Chafey P., Schaar B., Vinet M.C., Friocourt G., McDonell N., Reiner O., Kahn A., McConnell S.K., Berwald-Netter Y., Denoulet P., Chelly J. 1999. Doublecortin is a developmentaly regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 23, 2: 247-256

Friedenstein A.J., Piatetzky-Shapiro I.I., Petrakova K.V. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and experimental morphology*, 16, 3: 581-590

Gage F. H. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433–1438.

Gilbert S.F. 2003. Developmental biology, 7. izdaja. Sunderland, MA. Sinauer: 838 str.

Gleeson J.G., Allen K.M., Fox J.W., Lamperti E.D., Berkovic S., Scheffer I., Cooper E.C., Dobyns W.B., Minnerath S.R., Ross M.E., Walsh C.A. 1998. Doublecortin, a Brain-Specific Gene Mutated in Human X-linked Lissencephaly and Double Cortex Syndrome, Encodes a Putative Signaling Protein. *Cell*, 92, 1: 63-72

Gosden R.G. 2004. Germline stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more like a testis? *Human Reproduction Update*, 10, 3: 193-195

Gronthos S., Graves S.E., Ohta S., Simmons P.J. 1994. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*, 84 : 4164 – 73 .

Hermann A., Gastl R., Liebau S., Popa M.O., Fiedler J., Boehm B.O., Maisel M., Lerche H., Scwarz J., Brenner R., Storch A. 2004. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *Journal of Cell Science* 117, 4411-4422

Hermann A., Liebau S., Gastl R., Fickert S., Habisch H.J., Fiedler J., Schwarz J., Brenner R., Storch A. 2006. Comparative Analysis of Neuroectodermal Differentiation Capacity of Human Bone Marrow Stromal Cells Using Various Conversion Protocols. *Journal of Neuroscience Research* 83: 1502-1514

Herrera M.B., Bruno S., Buttiglieri S., Tetta C., Gatti S., Deregibus M.C., Bussolati B., Camussi G., 2006. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem cells*, 24: 2840-2850

Hoffman P.N., Cleveland D.W., Griffin J.W., Landes P.W., Cowan N.J., Price D.L. 1987. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 84, 10: 3472-3476

Hudson D.L., O'Hare M., Watt F.M., Masters J.R.W. 2000. Proliferative heterogeneity in the human prostate: evidence for epithelial stem cells. *Laboratory investigation*, 80: 1243-1250

Hwang W.S., Ryu Y.J., Park J.H., Park E.S., Lee E.G., Koo J.M., Jeon H.Y., Lee B.C., Kang S.K., Kim S.J., Ahn C., Hwang J.H., Park K.Y., Cibelli J.B., Moon S.Y. 2004. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*, 303, 5664: 1669-1674

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

Jalali A., Bonaguidi M., Hamill C., Kessler J.A. 2006. Multipotent stem cells in the embryonic nervous system .V knjigi: Neural development and stem cells, urednik: Rao M.S., 2.izdaja. Humana Press, Totowa, NJ, str.: 67 – 95

Jaenisch R., Eggan K., Humphreys D., Rideout W., Hochedlinger K. 2002. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. *Cloning and Stem Cells*, 4, 4: 389-396

Johnson G.V.W. in Jope R.S. 2004. The role od microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *Journal od Neuroscience Research*, 33, 4: 505-512

Kandel ER., Schwartz JH., Jessel TM. 2000. Principles of Neural Science. 4. izdaja. New York, McGraw-Hill: 280-286; 894-895, 1210-1226 str

Kassem M., Mosekilde L., Eriksen E.F. 1993. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 8: 1453 – 1458

Kesavapany S., Quarles R.H., Pant H.C. 2007. Neurofilaments: Phosphorylation and Signal Transduction., V: Intermediate Filaments, Springer US,52-73

Khoshnoodi J., Pedchenko V., Hudson B.G. 2008. Mammalian Collagen IV. Microscopy Research and Technique, 71, 5: 357-370

Kiel M.J., Morrison S.J. 2008. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. Nature Reviews Immunology, 8, 4: 290-301

Klimaskaya I., Chung Y., Becker S., Lu S.J., Lanza R. 2006. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. Nature, 444: 481-485

Koch C., Laurent G. 1999. Complexity and the nervous system. Science, 284: 96-98

Kolf C.M., Cho E., Tuan R.S. 2007. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Research and Therapy, 9, 1: 204

Kuroda H., Wessely O., De Robertis E.M. 2004. Neural induction in Xenopus: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, beta-Catenin, and Cerberus . PLoS Biology, 2 : E92

Kuznetsov S.A., Krebsbach P.H., Satomura K. in sod. 1997. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo . Journal of Bone and Mineral Research, 12 : 1335 – 47

Lavker R.M., Miller S., Wilson C., Cotsarelis G., Wei Z.-G., Yang J.-S., Sun T.-T. 1993 Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation. Jorunal of Investigative Dermatology, 101: 16S-26S

Levičar N., Motaln H., Lah-Turnšek T. 2009. Matične celice – znanstveni, zdravstveni in podjetniški izziv. Projekt Znanje žanje, predavanje na seji Državnega zbora, 17. november 2009

Lindvall O., Kokaia Z. 2006. Stem cells for the treatment of neurological disorders. Nature, 441: 1094-1096

Liu W., Ren C., Shi J. in sod. 2000. Characterization of the functionally related sites in the neural inducing gene noggin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 270 : 293 – 7

Locatelli F., Maccario R., Frassoni F., 2007. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders? Haematologica, 92, 7: 872-877

Lu B., Jan L., Jan Y.N. 2000. Control of cell divisions in the nervous system: symmetry and asymmetry. Annual Review of Neuroscience, 23 : 531 – 56

Luria E.A., Panasyuk A.F., Friedenstein A.Y. 1971. Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion*, 11 : 345 – 9

Luk J.M., Wang P.P., Lee C.K., Wang J.H., Fan S.T. 2005. Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models . *J Immunol Methods*, 305 : 39 – 47 .

Marchant L., Linker C., Ruiz P., Guerrero N., Mayor R. 1998. The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. *Developmental Biology*, 198 : 319 – 29

Marshall H., Morrison A., Studer M., Pöpperl H., Krumlauf R. 1996. Retinoids and Hox Genes. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 10: 969-978

Marshman E., Booth C., Potten C.S. 2002. The intestinal epithelial stem cell. *BioEssays*, 24, 1: 91-98

Martin G. 1981. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 12: 7634-7638

Martín-Ibáñez Raquel, Strömberg Anne Marie, Hovatta Outi, Canals Josep M. 2009. Cryopreservation of Dissociated Human Embryonic Stem Cells in the Presence of ROCK Inhibitor. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 10:1C.8.1-1C.8.15

McGuckin C.P., Forraz N., Baradez M.O., Navran S., Zhao J., Urban R., Tilton R., Denner L. 2005. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell proliferation*, 38, 4: 245-255

McGuckin C., Jurga M., Ali H., Strbad M., Forraz N. 2008. Culture of embryonic-like stem cells from human umbilical cord blood and onward differentiation to neural cells in vitro. *Nature protocols*, 3, 6: 1046-1055

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

Michalczyk K. in Ziman M. 2005. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histology and Histopathology*, 20, 2: 665-671

Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher L.W., Robey P.G., Shi S. 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 10: 5807-5812

Monitoring stem cell research. A report of the president's council on bioethics. 2004. Washington D.C., The president's Council on Bioethics <http://www.bioethics.gov/reports/stemcell/> (4.feb.2004), 417

Muotri A.R., Gage F.H. 2006. Generation of neuronal variability and complexity. Nature, 441: 1087 – 1093

Nestler EJ., Hyman SE., Malenka RC. 2001. Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience. New York, McGraw-Hill Companies, Inc:176-211

Okano H., Imai T., Okabe M. 2002. Musashi: a translational regulator of cell fate. Journal of Cell Science 115, 1355-1359

Ornitz D.M. in Itoh N. 2001. Fibroblast growth factors. Genome Biology 2: 1-12

Osborn M., Debus E., Weber K. 1984. Monoclonal antibodies specific for vimentin. European Journal of Cell Biology 34, 1: 137-143

Owen M. 1988. Marrow stromal stem cells. Journal of Cell Science Supplement,10 : 63 – 76

Pangršič T., Potokar M., Stenovec M., Kreft M., Fabbretti E., Nistri A., Pryazhnikov E., Khiroug L., Giniatullin R., Zorec R. 2007. Exocytotic Release of ATP from Cultured Astrocytes. The Journal of Biological Chemistry, 28, 39: 28749-28758

Périlleux E., Ansleme B., Richard D.1999. Biologija človeka – anatomija, fiziologija, zdravje. Prva izdaja. Ljubljana. DZS. 412 str.

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

Rickard D.J., Kassem M., Hefferan T.E., Sarkar G., Spelsberg T.C., Riggs B.L. 1996. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. Journal of Bone and Mineral Research, 11 : 312 – 24 .

Romalho-Santos M., Yoon S., Matsuzaki Y., Mulligan R.C., Melton D.A. 2002. »Stemness«: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. Science; 298: 597-600

Rožman P. in Jež M. 2010. Matične celice in napredno zdravljenje (zdravljenje s celicami, gensko zdravljenje in tkivno inženirstvo) – Pojmovnik. DCTIS – Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije

http://www.dctis.org/drustvo/o_nas.php

Rožman P., Strbad M., Knežević M. 2007. Uporaba matičnih celic v medicini. V. Genialna prihodnost – genetika, determinizem in svoboda. Mednarodni posvet Biološka znanost in

družba, Ljubljana, 4-5. okt. 2007, Ljubljana. Strgulc-Krajšek S., Popit T., Vičar M., Schrader Š. (ur.) Ljubljana, Zavod RS za šolstvo: 202-212

Roybon L., Ma Z., Asztely F., Fossum A., Jacobsen S.E.W., Brundin P., Li J-Y. 2006. Failure of Transdifferentiation of Adult Hematopoietic Stem Cells into Neurons. *Stem Cells*, 24:1594-1604

Serum. Encyclopedia Britannica. 2009. Encyclopedia Britannica Online. 29. april. 2009
<http://search.eb.com/eb/article-9015704>

Shashidharan P., Chalmers-Redman R.M.E., Carlile G.W., Rodic V., Gurvich N., Yuen T., Tatton W.G., Sealfon S.C. 1999. Nuclear translocation of GAPDH-GFP fusion protein during apoptosis. *Neuroreport*, 10, 5: 1149-1153

Silbernagl S., Lang F. 2000. Color atlas of Pathophysiology. Thieme New York. 406 str.

Slack J.M.W. 2000. Stem Cells in Epithelial Tissues. *Sicence*, 287, 5457: 1431-1433

Stenderup K., Justesen J., Eriksen E.F., Rattan S.I., Kassem M. 2001. Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis . *Journal of Bone and Mineral Research*, 16 : 1120 – 9 .

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

Streit A. 2007. The preplacodal region: an ectodermal domain with multipotential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia . *International Journal of Developmental Biology*, 51 : 447 – 61

Strelchenko N., Verlinsky O., Kukharenko V., Verlinsky Y. 2004. Morula – derived human embryonic stem cells. *Reproductive BioMedicine Online* 9: 623-629

Strickland S., Smith K.K., Marotti K.R. 1980. Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells: Generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyryl cAMP. *Cell*, 21, 2: 347-355

Suzuki A., Kaneko E., Ueno N., Hemmati-Brivanlou A. 1997. Regulation of epidermal induction by BMP2 and BMP7 signaling. *Developmental Biology*, 189 : 112 – 22

Temple S. 2001. The development of neural stem cells. *Nature*, 414 : 112 – 7

Temple S. 2006. Defining neural stem cells and their role in normal development of the nervous system . V: Neural development and stem cells , 2.izdaja, urednik: Rao M.S . Humana Press , Totowa, NJ: 1 – 28

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147

To L.B., Haylock D.N., Simmons P.J., Juttner C.A. 1997. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood*, 89: 2233-2258

Trachoo O., Rivolta M.N. 2009. Neural differentiation of human embryonic stem cells and their potential application in a therapy for sensorineural hearing loss. V: Trends in Stem Cell Biology and Technology, urednik: Baharvand H. Humana Press, New York, 261 – 282

Tsonis P.A. 2000. Regeneration in Vertebrates. *Developmetal Biology* 221: 273-284

van der Kooy D. & Weiss S. 2000. Why stem cells? *Science* 287: 1439–1441

Weissman I.L. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100: 157–168

Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 6619: 810-813

Wilson S.I., Edlund T. 2001. Neural induction: Toward a unifying mechanism . *Nature Neuroscience*, 4. Supplement : 1161 – 8

Zimmerman L.B., De Jesus-Escobar J.M., Harland R.M. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*, 86 : 599 – 606

Zipori D. 2005. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem cells*, 23, 6: 719-726

Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. *Tissue engineering*, 7, 2: 211-228

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju, izr. prof. dr. Primožu Rožmanu, ki me je navdušil nad znanostjo o matičnih celicah in regenerativni medicini ter mi omogočil delo v celičnem laboratoriju.

Posebna zahvala gre nepogrešljivi delovni mentorici, dr. Elviri Maličev, ki me je v laboratoriju vzela pod svoje okrilje, me uvedla v delo in objektivno razmišljanje.

Za nasvete in pomoč pri eksperimentalnem delu se zahvaljujem Mojci Jež in Marku Strbadu. Brez vajih ne bi šlo.

Zahvala gre tudi recenzentu, prof. dr. Borisu Bulogu in predsednici komisije, prof. dr. Jasni Štrus za hiter, a strokovni pregled naloge.

Najlepša hvala tudi mojim hipijem za pomoč pri reševanju avantgardnih tehničnih težav in večno dobro voljo.

PRILOGA

IZJAVA O POUČENOSTI IN PISNA PRIVOLITEV V POSTOPEK

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

Zavod RS za transfuzijsko medicino
Šlajmerjeva 6
SI-1000 Ljubljana

Podpisani/-a

rojen/-a

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

Eden izmed naslednjih strokovnjakov _____
me je seznanil/-a s postopki odvzema vzorca, hkrati pa tudi odgovarja za mojo varnost pri tem dejanju.

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

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

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

Datum:

Podpis preiskovanca/-ke:

