

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urška POTOČAR

**VPLIV ZAMRZOVANJA NA SPOSOBNOST
PROLIFERACIJE IN DIFERENCIACIJE MATIČNIH
CELIC IZ MAŠČOBNEGA TKIVA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urška POTOČAR

**VPLIV ZAMRZOVANJA NA SPOSOBNOST PROLIFERACIJE IN
DIFERENCIACIJE MATIČNIH CELIC IZ MAŠČOBNEGA TKIVA**

DIPLOMSKO DELO
univerzitetni študij

**EFFECTS OF CRYOPRESERVATION ON THE PROLIFERATIVE
AND DIFFERENTIATION POTENTIAL OF ADIPOSE-DERIVED
STEM CELLS**

GRADUATION THESIS
university studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del diplome je bil opravljen v laboratorijih podjetja Educell d.o.o v sodelovanju z Zavodom RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne, 16.06.2010, za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miomirja Kneževiča, za somentorico dr. Ariano Barlič, za recenzentko pa doc. dr. Tanjo Kunej.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: doc. dr. Miomir KNEŽEVIČ, univ. dipl. biol.
Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Član: dr. Ariana BARLIČ, univ. dipl. biol.
Educell d.o.o, Ljubljana

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

Datum zagovora:

Izjavljam, da je diplomska naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Urška POTOČAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 606:602.9:611.018 (043.2)
KG	ASC/matične celice/maščobno tkivo/lipoaspirat/krioprezervacija/osteogena diferenciacija/adipogena diferenciacija
AV	POTOČAR, Urška
SA	KNEŽEVIČ, Miomir (mentor)/BARLIČ, Ariana (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2010
IN	VPLIV ZAMRZOVANJA NA SPOSOBNOST PROLIFERACIJE IN DIFERENCIACIJE MATIČNIH CELIC IZ MAŠČOBNEGA TKIVA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 50 str., 16 pregl., 16 sl., 53 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V okviru diplomske naloge smo preučevali vpliv krioprezervacije na viabilnost, proliferacijo ter na diferencijski potencial ASC (angl. Adipose-derived Stem Cells). Slednji je v pripravi tkivno-inženirskih pripravkov nadvse pomemben, zato bi morebiten negativen vpliv krioprezervacije oteževal uporabo ASC v celičnih terapijah. Matične celice smo iz lipoaspirata izolirali z encimsko razgradnjo s kolagenazo. Izplen je bil velik, a je med vzorci precej variabilen. Iz 100 ml vzorca smo v povprečju dobili $1,1 \times 10^6$ ASC. Polovico pridobljenih celic smo za en mesec zamrznili, preostanek pa nasadili v D-MEM/F12 ob dodatku 10 % humanega seruma. Celice druge in sedme pasaže smo izpostavili različnim indukcijskima medijema. Adipogeno diferenciacijo smo po 10 dneh dokazovali z barvilom Red Oil O, osteogeno pa med 21. in 26. dnem z barvanjem von Kossa. Popolnoma enak postopek gojenja in indukcije smo ponovili tudi z zamrznjenimi celicami ter izvedli primerjavo dobljenih rezultatov. Več kot 90 % viabilnost kaže na dobro optimiziran protokol krioprezervacije. Regeneracija je bila tudi po odmrznitvi hitra, pomnoževanje pa je bilo le malenkost počasnejše. Diferenciacija ASC je potekala skoraj nespremenjeno glede na nezamrznjene vzorce. Predvidevamo, da ima na proliferacijo in diferenciacijo večji vpliv število progenitorskih celic, ki jih zajamemo v vzorec za indukcijo kot pa sama krioprezervacija. Glede na dobljene rezultate lahko zaključimo, da enomesečna krioprezervacija ne vpliva bistveno na ASC, zato so celice tudi po enem mesecu zamrzovanja primerne za tkivno-inženirske aplikacije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 606:602.9:611.018 (043.2)
CX	ASC/stem cells/adipose tissue/lipoaspirat/osteogenic differentiation/adipogenic differentiation
AU	POTOČAR, Urška
AA	KNEŽEVIĆ, Miomir(supervisor)/BARLIČ, Ariana (co-supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study Programme of Biotechnology
PY	2010
TI	EFFECTS OF CRYOPRESERVATION ON THE PROLIFERATIVE AND DIFFERENTIATION POTENTIAL OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XII, 50 p., 16 tab., 16 fig., 53 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	In the framework of the graduation thesis, the effect of the cryopreservation on the viability, on the proliferation and on the differentiation of the ASC potential (Adipose-derived Stem Cells) was researched. The latter is most important when preparing the tissue engineering applications, therefore the possible negative effect of cryopreservation could complicate the application of the ASC in the cell therapy. The stem cells were isolated from the lipoaspirate with enzyme breakdown through collagenase. The yield was substantial, though it varied among samples. Out of the 100 ml sample $1,1 \times 10^6$ ASC was obtained in average. One half of the obtained cells had been frozen for a month and the rest had been cultured in D-MEM/F12 by adding a 10 % of human serum. The cells of the second and the seventh passage had been exposed to different induction media. After ten days, the adipogenic differentiation had been proven with the Red Oil O dye, and between 21th and 26th day the osteogenic differentiation with the von Kossa stain. Exactly the same procedure of cultivation and induction had been repeated with the use of frozen cells, followed by the comparison of the results. More than 90 % viability reflected a well optimized cryopreservation protocol. After defrosting also the regeneration had been rapid, yet the amplification had been a bit slower. The ASC differentiation was almost unchanged compared to the not-frozen samples. We estimate that the number of progenitor cells captured in a sample for induction has a greater impact on the proliferation and differentiation than the cryopreservation itself. Following the results obtained it can be concluded that the one-month cryopreservation has no substantial influence/impact on the ASC, therefore even after one month of freezing the cells are still suitable for tissue engineering applications.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija.....	III
Key words documentation.....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic.....	VII
Kazalo slik.....	VIII
Okrajšave in simboli.....	IX
Slovarček.....	X
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 NAMEN NALOGE.....	1
1.3 DELOVNA HIPOTEZA.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 MATIČNE CELICE.....	3
2.2 MAŠČOBNO TKIVO.....	4
2.3 MATIČNE CELICE IZ MAŠČOBNEGA TKIVA (ASC).....	6
2.3.1 Postopki izolacije.....	8
2.4 KRIOPREZERVACIJA/ZAMRZOVANJE.....	11
2.5 KLINIČNA UPORABA MATIČNIH CELIC IZ MAŠČOBE DANES IN V PRIHODNOSTI.....	13
2.5.1 Zdravljenje in regeneracija mehkih tkiv.....	13
2.5.2 Zdravljenje kostnih poškodb in defektov.....	13
2.5.3 Zdravljenje gastroenteroloških bolezni.....	14
3 MATERIALI IN METODE.....	15
3.1 LABORATORIJSKA OPREMA, MATERIAL, KEMIČALIJE IN GOJIŠČA.....	15
3.1.1 Laboratorijska oprema.....	15
3.1.2 Material.....	15
3.1.3 Kemičalijske.....	16
3.1.4 Gojišča in raztopine.....	16
3.2 METODE.....	18
3.2.1 Potek poskusov.....	18
3.2.2 Potek gojenja matičnih celic in diferenciacija.....	19
3.2.2.1 Izolacija SVF iz maščobnega tkiva in priprava primarne kulture.....	19

3.2.2.2 Spiranje celic primarne kulture.....	20
3.2.2.3 Dohranjevanje celične kulture.....	20
3.2.2.4 Tripsinizacija.....	20
3.2.2.5 Štetje celic s števno komoro.....	21
3.2.2.6 Nasaditev celic v prvo pasažo.....	22
3.2.2.7 Popuacijsko podvajanje.....	22
3.2.2.8 Diferenciacija matičnih celic iz lipoaspirata v adipogeno in osteogeno linijo.....	22
3.2.2.9 krioprezervacija ali shranjevanje celic v tekočem dušiku.....	23
3.2.2.10 Odmrzovanje.....	23
3.2.3 Karakterizacija diferenciacije v adipogeno in osteogeno linijo.....	23
3.2.3.1 Barvanje Red Oil O.....	23
3.2.3.2 Barvanje von Kossa.....	24
4 REZULTATI.....	25
4.1 MORFOLOGIJA ASC GOJENIH V MONOSLOJNI KULTURI.....	25
4.2 IZKORISTEK CELIC GLEDE NA VOLUMEN LIPOASPIRATA.....	26
4.3 VPLIV KRIOPREZERVACIJE NA OHRANITEV VIABILNOSTI MATIČNIH CELIC IZ LIPOASPIRATA.....	27
4.4 KVALITATIVNO VREDNOTENJE ADIPOGENE IN OSTEOGENE DIFERENCIACIJE PRI NEZAMRZNJENIH MATIČNIH CELICAH IZ LIPOASPIRATA(ASC).....	27
4.5 KVALITATIVNO VREDNOTENJE ADIPOGENE IN OSTEOGENE DIFERENCIACIJE PRI ZAMRZNJENIH MATIČNIH CELICAH IZ LIPOASPIRATA(ASC).....	29
4.6 PROLIFERACIJSKA IN DIFERENCIACIJSKA SPOSOBNOST NEZAMRZNJENIH MATIČNIH CELIC IZ LIPOASPIRATA (ASC).....	31
4.7 PROLIFERACIJSKA IN DIFERENCIACIJSKA SPOSOBNOST ZAMRZNJENIH MATIČNIH CELIC IZ LIPOASPIRATA (ASC).....	34
4.8 PRIMERJAVA POPULACIJSKEGA PODVAJANJASVEŽIH IN ZAMRZNJENIH VZORCEV.....	36
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	39
5.1 RAZPRAVA.....	39
5.2 SKLEPI.....	43
6 POVZETEK.....	44
7 VIRI.....	46
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1	Klasifikacija matičnih celic glede na njihov diferenciacijski potencial (Choumerianou in sod., 2008).	3
Preglednica 2	Seznam uporabljene laboratorijske opreme.	15
Preglednica 3	Seznam uporabljenega materiala.	15
Preglednica 4	Seznam uporabljenih kemikalij.	16
Preglednica 5	Razmerje med velikostjo posode in volumnom uporabljenih kemikalij pri tripsinizaciji.	21
Preglednica 6	Količina dodanega zamrzovalnega medija v odvisnosti od števila celic.	23
Preglednica 7	Izplen celic glede na volumen lipoaspirata.	26
Preglednica 8	Ohranitev viabilnosti ASC po enomesečni zamrznitvi.	26
Preglednica 9	Primerjava uspešnosti adipogene in osteogene diferenciacije 2. in 7. pasaže nezamrznjenih vzorcev.	29
Preglednica 10	Primerjava uspešnosti adipogene in osteogene diferenciacije 2. in 7. pasaže zamrznjenih vzorcev.	31
Preglednica 11	Primerjava PD svežih in zamrznjenih vzorcev HI007 ter odstotek PD zamrznjenih celic glede na nezamrznjene.	36
Preglednica 12	PD za svež in zamrznjen vzorec RM008 ter odstotek PD zamrznjenih celic v primerjavi z nezamrznjenimi.	36
Preglednica 13	PD za svež in zamrznjen vzorec XY009 ter odstotek PD zamrznjenih celic glede na nezamrznjene.	37
Preglednica 14	PD za svež in zamrznjen vzorec KA010 ter odstotek populacijskega podvajanja zamrznjenih celic glede na nezamrznjene.	37
Preglednica 15	Povprečne vrednosti kumulativ PD ter izračun števila celic, ki jih tekom pasaž pridobimo iz ene celice.	38
Preglednica 16	Povprečne vrednosti kumulativ PD ter izračun števila celic, ki jih tekom pasaž pridobimo iz ene celice.	38

KAZALO SLIK

Slika 1	Postopek izolacije ASC iz maščobnega tkiva - iz lipoaspirata.	9
Slika 2	Shema postopka izolacije ASC iz maščobnega tkiva (lipoaspirata).	10
Slika 3	Shema poteka postopkov od izolacije SVF do končne diferenciacije.	19
Slika 4	Morfologija ASC gojenih v enoslojni kulturi.	26
Slika 5	Fotografije ASC pred in po barvanju z Red Oil O. Primerjava uspešnosti diferenciacije 2. in 7. pasaže pri vzorcu KA010.	28
Slika 6	Fotografije ASC po izvedenem barvanju von Kossa. Primerjava uspešnosti osteogene diferenciacije 2. in 7. pasaže pri vzorcu HI007.	29
Slika 7	Fotografije ASC po barvanju z Red Oil O.	30
Slika 8	Fotografije ASC po izvedenem barvanju von Kossa.	31
Slika 9	Kumulativa populacijskega podvajanja za vzorec HI007.	32
Slika 10	Kumulativa populacijskega podvajanja za vzorec RM008.	32
Slika 11	Kumulativa populacijskega podvajanja za vzorec XY009.	33
Slika 12	Kumulativa populacijskega podvajanja za vzorec KA010.	33
Slika 13	Kumulativa populacijskega podvajanja za zamrznjen vzorec zHI007.	34
Slika 14	Kumulativa populacijskega podvajanja za zamrznjen vzorec zRM008.	34
Slika 15	Kumulativa populacijskega podvajanja za zamrznjen vzorec zXY009.	35
Slika 16	Kumulativa populacijskega podvajanja za zamrznjen vzorec zKA010.	35

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ASC	matična celica iz maščobnega tkiva (angl. Adipose-derived Stem Cell)
BMSC	matična celica iz kostnega mozga (angl. Bone Marrow Stem Cell)
BAT	rjavo maščobno tkivo (angl. Brown Adipose Tissue)
CAL	metoda obogatene maščobe (angl. Cell Assisted Lipotransfer)
D-MEM	Dulbeccovo modificirano gojišče (angl. Dulbecco's modified Eagle's medium)
D-MEM/F12	Dulbeccovo modificirano gojišče: hranilna mešanica F-12 (angl. Dulbecco's modified Eagle's medium: nutrient mixture F-12)
D-MEM/LG	Dulbeccovo modificirano gojišče z nizkim deležem glukoze (angl. Dulbecco's modified Eagle's medium with low-glucose)
DMSO	dimetil sulfoksid
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
EMC	embrionalne matične celice (angl. Embryonic Stem Cell)
FBS	goveji serum (angl. Fetal Bovine Serum)
GP	gojilna posoda
HBSS	Hanksova osmolarna raztopina soli
HLA	humani levkocitni antigen (angl. Human Leukocyte Antigen)
hSG	humano serumsko gojišče
KME	Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko
MC	matična celica (angl. Stem Cell)
MMC	mezenhimski matična celica (angl. Mesenchymal Stem Cell - MSC)
N	število živih celic v suspenziji
n	povprečno število prešteti celic v kvadratu števne komore
N_Z	začetno število nasajenih celic
N_H	izplen oz. pridobljeno število celic
PBS	fosfatni pufer (angl. Phosphate Buffered Saline)
PD	populacijsko podvojevanje
P0	primarna kultura
P1	prva pasaža
R	faktor redčenja zaradi mešanja s tripanskim modrilom
SVF	stromalna vaskularna frakcija (angl. Stromal Vascular Fraction)
UCB	popkovnična kri (angl. Umbilical Cord Blood)
V	volumen celične suspenzije, iz katere smo odvzeli vzorec
WAT	belo maščobno tkivo (angl. White Adipose Tissue)

SLOVARČEK

Adipogena diferenciacija	Je proces, v katerem manj specializirana celica pridobi lastnosti maščobnih celic.
ASC	Matične celice iz maščobnega tkiva (angl. Adipose-derived Stem Cells).
Biobanka	Ustanova, ki zbira, obdeluje in shranjuje različne biološke vzorce, celice, tkiva in organe in vodi o njih ustrezno podatkovno bazo. Pri tem gre lahko za shranjevanje bioloških, agronomskih, veterinarskih, forenzičnih ali medicinskih vzorcev. Populacijska biobanka je zbirka bioloških materialov, ki reprezentativno pokriva določeno populacijo, zbrane vzorce in vse podatke o njih pa kontrolirano uporablja v znanstvene namene (Rožman in Jež, 2009).
BMSC	Matične celice iz kostnega mozga (angl. Bone Marrow Stem Cells).
Citokini	Citokini so topni izločki celic, ki omogočajo medcelično komunikacijo, spodbudijo imunski odziv in razmnoževanje celic. Termin citokin se nanaša na heterogeno skupino topnih proteinov in peptidov, ki v nanomolarnih in pikomolarnih koncentracijah delujejo kot humoralni regulatorji in v normalnih ali patoloških pogojih regulirajo delovanje tkiv in celic (Rožman in Jež, 2009).
Diferenciacija	Je proces, v katerem manj specializirana celica pridobi lastnosti bolj specializiranih celic (Rožman in Jež, 2009).
EMC	Embrionalne matične celice so pluripotentne matične celice, ki jih najdemo v zgodnjem zarodku – blastocisti (~5. dan) in jih lahko izoliramo iz notranje celične mase, preden ta začne tvoriti klične plasti (Rožman in Jež, 2009).
Fibroblast	Celica vezivnega tkiva sploščene podolgovate oblike s citoplazemskimi izrastki in ovalnim jedrom. Celica veziva, vretenaste ali zvezdaste oblike, z velikim, ovalnim, blede barvajočim se jedrom, ki tvori kolagenska, retikulinska in elastična vlakna ter proteoglikane (Rožman in Jež, 2009).
Hematopoeza	Proces tvorbe krvnih celičnih komponent, ki nastajajo iz hematopoetskih matičnih celic.
In vitro	V epruveti oziroma v umetnem okolju (Rožman in Jež, 2009).
In vivo	V živem osebku oz. v naravnem okolju (Rožman in Jež, 2009).

Konfluenca	Preraščenost dna gojilne posodice s celicami. Če so celice konfluentne pomeni, da so popolnoma prerasle dno posode (Rožman in Jež, 2009).
Kostni mozeg	Mehko tkivo, ki se nahaja v dolgih kosteh. V kostnem mozgu poteka hematopoeza. Med različnimi odraslimi celicami vsebuje tudi več vrst matičnih celic, npr. mezenhimske, krvotvorne in druge matične celice (Rožman in Jež, 2009).
Krioprezervacija	Postopek dolgotrajnega shranjevanja celic in drugega biološkega materiala pri izjemno nizkih temperaturah (Simione, 1998).
Krioprotektanti	Substance, ki omogočajo dolgotrajno shranjevanje biološkega materiala, saj med zamrzovanjem preprečujejo poškodbe tkiva. Poleg DMSO-ja in glicerola, ki sta najpogostejše v uporabi, poznamo še etilenglikol, propilenglikol, saharozo in trehalozo.
Limfociti	Celice, prisotne v krvi in limfatičnih organih kot glavni vir imunske sposobnosti organizma, da lahko prepozna tuje snovi in proti njim tudi reagira.
Lipoaspirat	Aspirat liposukcije je maščobno tkivo pridobljeno pri liposukciji.
Liposukcija	Pogosta metoda odstranjevanja oz. izsesavanja odvečnega maščobnega tkiva v estetski kirurgiji.
Matična celica	Nediferencirana celica, ki se s t.im. nesimetrično delitvijo lahko samoobnavlja, pri čemer nastane ena njej enaka hčerinska celica, hkrati pa druga, bolj diferencirana hčerinska celica. Ta ima manjši razvojni potencial, ker je bolj diferencirana. Za matično celico velikokrat napačno uporabljajo napačen sinonim "izvorna celica", ki ustreza terminu "primordialna celica", zato dejansko ni ustrezen (Rožman in Jež, 2009).
Mezodermalna plast embrija	Gre za eno od embrionalnih plasti. Embrio je namreč iz treh plasti, in sicer iz ektoderma, endoderma ter mezoderma.
MMC	Mezenhimske matične celice so multipotentne matične celice, ki se lahko diferencirajo v celice kosti, hrustanca, mišic in v maščobne celice. Nahajajo se tudi v kostnem mozgu, ki je vir mnogih vrst matičnih celic (Rožman in Jež, 2009).
Osteogena diferenciacija	Proces, v katerem manj specializirana celica pridobi lastnosti kostnih celic (Rožman in Jež, 2009).
Pasaža	Presaditev celic v celični kulturi. Ponavadi jo opravimo, ko celice v kulturi dosežejo konfluentno stanje (Rožman in Jež, 2009).

Plastičnost	Sposobnost tkivnih matičnih celic (MC odraslega), da se spremenijo v celico drugega kličnega lista ali da se spremenijo v odrasle celice drugega tkiva, kamor jih pred tem prenesemo. 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 (Rožman in Jež, 2009).
Podvojevalni čas	Generacijski čas nam pove, koliko časa potrebujejo celice za podvojitev. Krajši podvojevalni čas pomeni večje število delitev.
Preadipociti	Celice, ki jih najdemo v maščobnem tkivu odraslega človeka in se diferencirajo v zrele maščobne celice ali adipocite.
Progenitorska celica	Izraz za vsako delečo se celico, ki se lahko diferencira v različne potomke.
Proliferacija	Podvojevanje celic in njihov razvoj (Rožman in Jež, 2009).
Senescenca	Senescenca ali celično staranje je aktiven razvojni proces, ki vodi v prenehanje delitve celic, akumulacijo metabolnih produktov in celično smrt. Odmiranje in prenehanje delitve celic se odražata tudi na delovanju organov in splošnem slabljenju organizma in tudi v spremenjenem delovanju diferenciranih celic
Teratom	Tumor sestavljen iz skupka različnih tipov tkiva. Vsebuje celice vseh treh embrionalnih plasti. Če pluripotentne matične celice vbrižgamo v imunokompromitirane miške, se razvijejo v teratom, kar uporabljamo kot bistveni in vivo dokaz njihove pluripotentnosti (Rožman in Jež, 2009).
Transformacija	Maligna transformacija: sprememba normalne celice v maligno, ponavadi to pomeni, da celica pridobi sposobnost neskončnega pomnoževanja – postane nesmrtna (Rožman in Jež, 2009).
Transplantacija	Presaditev celic, tkiva ali organa darovalca v telo prejemnika. Po tej definiciji je najbolj pogosta oblika transplantacije transfuzija krvi (Rožman in Jež, 2009).
Tripsinizacija	Postopek odlepljanja celic enoslojne kulture z dna gojilne posode s pomočjo encima tripsina. Najugodnejši čas za presaditev celic v novo, večjo posodo je, ko le-te dosežejo 70 % - 90 % konfluenco.
Viabilnost	Viabilnost ali živost je sposobnost celic, da v danem okolju preživijo, rastejo in se delijo.

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Tkivno inženirstvo in regenerativna medicina sta multidisciplinarni vedi, ki s svojim pristopom predstavljata novo upanje v zdravstvu. Ponujata možnost regeneracije poškodovanih tkiv, organov ter možnost povrnitve njihove normalne funkcije in strukture. Gre torej za ustvarjanje živih, funkcionalnih tkiv za zdravljenje poškodb, ali za nadomestek tkiva ali organa, katerega funkcija ni več zadovoljiva bodisi zaradi starosti bodisi zaradi poškodb, bolezni (Rada in sod., 2009).

Tekom življenja se mora naše telo zaradi obrab in poškodb nenehno obnavljati. Za regeneracijo in obnavljanje poškodovanih tkiv skrbi posebna vrsta celic, ki se v telesu nahaja vse življenje. Imenujemo jih matične celice (MC; angl. Stem Cells – SC). Glavna lastnost, ki jih loči od drugih celic, je njihova sposobnost samoobnavljanja ter zmožnost diferenciacije v specializirane celične tipe (Choumerianou in sod., 2008). Ločimo dve glavni vrsti matičnih celic, in sicer embrionalne matične celice (EMC; angl. Embryonic Stem Cells – ESC), ki jih pridobimo iz zarodka ter matične celice odraslega organizma (MMC; angl. Mesenchymal Stem Cells – MSC). Slednje najdemo v kostnem mozgu (angl. Bone Marrow Stem Cells – BMSC), v maščevju (angl. Adipose-derived Stem Cells – ASC), periferni krvi, jetrih, zobni pulpi, koži, epiteliju, popkovnični krvi ter mnogih drugih tkivih in organih. Glede na sposobnost diferenciacije delimo MC na totipotentne (EMC), pluripotentne in multipotentne (MSC) (Choumerianou in sod., 2008).

ASC zaradi lahke dostopnosti, številčnosti in velikega diferenciacijskega potenciala kažejo perspektivne možnosti uporabe v klinične namene. K temu veliko prispeva tudi uspešnost kliničnih študij pri zdravljenju kronove bolezni, diabetesa, kardiovaskularnih bolezni, pa tudi v rekonstrukcijski kirurgiji in tkivnem inženirstvu kosti. Kljub naraščajočemu zanimanju za uporabo ASC pa bodo koristno in varno uporabo omogočile le dodatne študije in raziskave (Schäffler in Büchler, 2007). Obetajoči rezultati uporabe ASC v regenerativni medicini torej kažejo na smiselnost shranjevanja teh celic v biobankah za potencialno uporabo v prihodnosti, zato je zamrzovanje v celotnem procesu zelo pomemben dejavnik. V diplomski nalogi smo zato preučevali vpliv zamrzovanja na proliferacijsko in diferenciacijsko sposobnost matičnih celic iz maščobnega tkiva. Osredotočili smo se na adipogeno in osteogeno diferenciacijo ter preverili, kako se ta diferenciacijska sposobnost spreminja tekom pasažiranja.

1.2 NAMEN NALOGE

Namen našega dela je bil preveriti, kako se tekom gojenja in pasažiranja spreminja diferenciacijski potencial matičnih celic iz maščobe (ASC). Zanimal nas je tudi vpliv zamrzovanja v tekočem dušiku na celice. Pri primerjanju sposobnosti diferenciacije smo se osredotočili predvsem na osteogeno (diferenciacija v smeri kostnih celic) in adipogeno (diferenciacija v smeri maščobnih celic) diferenciacijo.

Želeli smo:

- ovrednotiti izkoristek pridobivanja ASC iz lipoaspirata,
- preveriti vpliv gojenja in pasažiranja na sposobnost razmnoževanja in diferencijski potencial celic,
- preveriti vpliv zamrzovanja na preživetje, sposobnost razmnoževanja in diferencijski potencial celic,
- kvalitativno ovrednotiti adipogeno in osteogeno diferenciacijo ASC z biokemijskimi metodami barvanja,
- določiti minimalno količino tkiva, ki bi zadostovala za pripravo nekega tkivno-inženirskega pripravka.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Pričakovali smo, da se bodo izkoristki pridobivanja ASC razlikovali zaradi biološke variabilnosti med osebki, različnih mest odvzema ter načina odvzema tkiva.

Pričakovali smo upad proliferacijskih in diferencijskih sposobnosti tekom gojenja in pasažiranja celic.

Predvidevali smo tudi, da zamrzovanje ob uspešnem preživetju celic ne bo vplivalo na proliferacijo in diferencijske sposobnosti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MATIČNE CELICE

Matične celice so nediferencirane celice, ki se nahajajo v vseh tkivih. Njihova posebnost je asimetrična delitev, katere posledica je nastanek dveh neenakih celic. Pri delitvi tako nastane ena usmerjena prednica, ki se glede na potrebe usmeri in diferencira v določeno tkivo, druga hčerinska celica pa je enaka materinski MC (Rožman in Jež, 2009). Glavna lastnost, ki jih loči od drugih celic, je njihova sposobnost samoobnavljanja ter zmožnost diferenciacije v specializirane celične tipe.

Matične celice so torej progenitorji za samoobnovo tkiv. Za diferenciacijo v funkcionalno tkivo je potrebno dobro razumevanje biologije in poznavanje lastnosti MC. Zaradi dostopnosti humanih MC se upanje za njihovo uporabo v celičnih terapijah povečuje, hkrati pa te celice omogočajo razumevanje embrionalnega razvoja in predstavljajo mehanizem za preučevanje napredovanja bolezni (Choumerianou in sod., 2008). Klasifikacija deli MC glede na izvorno tkivo, v katerem se nahajajo, ter na sposobnost diferenciacije. Poznamo embrionalne, germinalne ter somatske MC, slednje delimo še na fetalne in odrasle. Glede na sposobnost diferenciacije jih delimo na totipotentne, pluripotentne in multipotentne. Podrobnejši prikaz z opisi je prikazan v spodnji tabeli.

Preglednica 1: Klasifikacija matičnih celic glede na njihov diferenciacijski potencial (Choumerianou in sod., 2008)

TIP MATIČNE CELICE	OPIS	PRIMER
Totipotentne	Razvijejo se lahko v katerikoli celični tip in so torej sposobne tvoriti celoten organizem vključno z ekstraembrionalnim tkivom (trofoblast). Med totipotentne celice sodita zigota in blastomere (nastanejo v zgodnjih celičnih delitvah morule). Med nastankom blastociste pride do prve diferenciacije celic in izgube totipotentnosti (Rožman in Jež, 2009).	Celice iz zgodnjega embria (1 – 3 dni, EMC – embrionalne matične celice).
Pluripotentne	Pluripotentne celice se lahko razvijejo v skoraj katerikoli celični tip (preko 200 različnih tipov celic) vključno z germinalnimi celicami. Pluripotentnost pomeni sposobnost celice, da se razvije v vse tri embrionalne plasti (endoderm, mezoderm in ektoderm) (Rožman in Jež, 2009).	Nekatere celice blastociste (5 – 14 dni).
Multipotentne	Diferencirajo se lahko le v določen, specifičen tip celic oz. v celice, ki pripadajo isti liniji. Večina tkivno specifičnih matičnih celic iz odraslih tkiv je multipotentnih.	Zarodna tkiva, popkovnična in periferna kri, kostni mozeg, maščobno tkivo.
Unipotentne	Celica je sposobna razvoja v le eno celično linijo (Rožman in Jež, 2009).	Predniške epitelne celice.

Embrionalne matične celice imajo neomejen diferenciacijski potencial, a so hkrati predmet številnih etičnih in legalnih vprašanj ter političnih dilem (Locke in sod., 2009). Poleg naštetega obstaja velika verjetnost tvorbe teratomov. Uporabo matičnih celic iz popkovnične krvi (angl. Umbilical Cord Blood – UCB) omejujejo praktične zahteve pri pridobivanju in izolaciji. Problem predstavlja tudi zagotavljanje ustreznega shranjevanja za kasnejšo avtologno uporabo, primerjava z MC iz kostnega mozga (angl. Bone-Marrow Stem Cells – BMSC) pa kaže na slabši diferenciacijski potencial UCB (Kern in sod., 2006).

Matične celice iz odraslih tkiv so se kljub slabši potentnosti izkazale kot najprimernejše za zdravljenje, saj imajo številne prednosti, poleg tega pa njihova uporaba ni etično sporna. Idealne lastnosti tkiva za pridobivanje matičnih celic so: čim večji izplen celic, minimalno invaziven proces pridobivanja oz. izolacije, sposobnost diferenciacije v multiple celične linije z zmožnostjo regulacije, varna in učinkovita transplantacija ter proizvodnja v skladu z načeli dobre laboratorijske prakse (Gimble in sod., 2007).

2.2 MAŠČOBNO TKIVO

Maščobno tkivo je kompleksno tkivo iz različnih celic. Le 1/3 tkiva predstavljajo maščobne celice ali adipociti, ostalo tkivo je sestavljeno iz ASC, preadipocit, fibroblastov, makrofagov, endotelijskih celic, vaskularnih gladkih mišičnih celic in limfocitov. Osnovna funkcija maščobnega tkiva je toplotna izolacija, poleg shranjevanja energije pa ima tudi endokrino vlogo (Schäffler in Büchler, 2007).

Maščobno tkivo izhaja iz mezodermalne plasti embria in se razvija pre- in postnatalno. Adipocite lahko v embriju mikroskopsko opazimo v drugem trimesečju (Gimble in sod., 2007).

Makroskopsko ločimo vsaj pet različnih vrst maščobnega tkiva, in sicer kostni mozeg, rjavo, žlezno, mehansko in belo maščobno tkivo. Maščoba v kostnem mozgu ima aktivno in hkrati pasivno funkcijo. Nahaja se na mestih, kjer je včasih potekala hematopoeza in služi kot rezerva energije ter predstavlja vir citokinov za osteogenezo in hematopoezo. Žlezno maščobo regulirajo hormoni nosečnosti in ima velik pomen med laktacijo, saj zagotavlja hranila in energijo. Podporo rokam, očem in drugim kritičnim strukturam nudi mehanska maščoba. Rjavo maščevje (angl. Brown Adipose Tissue – BAT) ima termogeno vlogo (Gimble in sod., 2007). Najdemo ga okoli glavnih vitalnih organov (srce, ledvica, aorta, gonade) dojenčkov, pri odraslih pa ga ni več oz. se s staranjem morfološko spremeni, saj začne kopičiti lipide. Belo maščobno tkivo (angl. White Adipose Tissue – WAT) se formira tekom embrionalnega razvoja. Predstavlja skladišče energije in omogoča izolacijo telesa. Ločimo dve vrsti, in sicer intraabdominalno ali visceralno belo maščobno tkivo ter podkožno belo maščobno tkivo – površinsko in globoko podkožno tkivo (Avram in sod., 2005).

Maščevje je bilo vse do 80-ih obravnavano kot mesto shranjevanja energije, znanstveni izsledki zadnje dekad pa govorijo v prid tezi, da gre pravzaprav tudi za največji endokrini organ (Mohamed-ali in sod., 1998; Friedman in Halaas, 1998). Adipociti so namreč presnovno aktivne celice, ki izločajo leptin, adiponektin, rezistin, interleukin 6 (IL-6),

dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF-alfa), visfatin in omentin (Rondinone, 2006) ter druge citokine. Leptin je adipocitokin, katerega glavna naloga je uravnavanje energetskega ravnovesja. Zmanjšuje občutek lakote, poveča porabo energije, hkrati pa spodbuja simpatični živčni sistem in igra vlogo v kontroli žilnega tonusa. Njegovo pomanjkanje vodi v zmanjšano porabo energije in bolešno debelost (Friedman in Halaas, 1998). Med adipocitokine spada tudi adiponektin, ki ga izločajo le adipociti. Spodbuja občutljivost za inzulin, izboljšuje toleranco za glukozo in zavira vnetje. Rezistin je vpleten v patogenezo sladkorne bolezni tipa 2 in debelosti, pri katerih je raven tega citokina povišana (Bajuk – Studen in sod., 2009). IL-6 zavira privzem lipidov iz obtoka v adipocite in spodbuja tvorbo trigliceridov v jetih (Nonogaki in sod., 1995). TNF-alfa spodbuja izločanje IL-6, pa tudi nastanek vnetnega proteina, ki je značilno povezan z debelostjo, inzulinsko rezistenco, endotelno disfunkcijo in s tem ogroženostjo za razvoj srčno-žilnih bolezni. Visfatin pa nastaja v visceralnem maščevju, veže se na inzulinski receptor ter ga aktivira (Fukuhara in sod., 2005).

O odkritju oz. o obstoju matičnih celic (ASC) v maščevju so prvič poročali leta 2001 (Zuk in sod., 2001). Zanimanje za maščobno tkivo je zato močno naraslo in privedlo do številnih novih odkritij. Zaradi svoje dostopnosti, obilnosti in sposobnosti samoobnavljanja predstavlja atraktiven vir progenitorskih celic (Schäffler in Büchler, 2007). Enostavno pridobivanje večjih količin tkiva brez nevarnosti za pacienta pa predstavlja glavno prednost (Rada in sod., 2009).

Znanstvenike so k razmišljanju o prisotnosti ASC v maščobnem tkivu spodbudile različne humane patologije, kot so progresivna kostna heteroplazija, lipomi in liposarkomi. Progresivna kostna heteroplazija (POH) je avtosomalna dominantna dedna bolezen, kjer pride do formacije kosti znotraj subkutane plasti kože (Kaplan in sod., 1994). Je redka razvojna motnja mezenhimske diferenciacije, ki se navadno začne v otroštvu. Kosti se torej formirajo na mestih, kjer se ne bi smele. Začne se s tvorbo v koži, sledijo podkožna tkiva (maščobno tkivo pod kožo), napreduje pa lahko celo do mišic, kit in vezi. Tvorba se torej širi od zunanjih tkiv proti notranjim (Urtizberea in sod., 1998). Če pride do formacije kosti v bližini sklepov, to privede do togosti, blokiranja in trajne nepremičnosti sklepa. Vzrok za tvorbo kosti je najverjetneje osteogena diferenciacija mezenhimskih matičnih celic.

Hipotezo o obstoju ASC v maščobnem tkivu potrjujejo tudi različni tumorji mehkih tkiv, med katerimi so najpogostejše diagnosticirani lipomi in liposarkomi. Navadno se pojavljajo v podkožju ali visceralni maščobi in imajo počasno proliferacijo (Gimble in sod., 2007). Študije kažejo na neposredno povezanost matičnih celic z debelostjo. Zrele adipocite naj bi bile končno diferencirane celice z omejeno sposobnostjo proliferacije in replikacije, zato populacija MC v maščobi skrbi za nadomeščanje zrelih adipocitov tekom življenja posameznika (Cornelius in sod., 1994). Nekateri znanstveniki so celo predpostavili, da se s pomočjo homeostatskega mehanizma volumen maščobnega tkiva v telesu celo življenje vzdržuje na konstantni ravni (Cone, 1999). Hitra izguba ali odstranitev maščobe (liposukcija, dieta) dolgoročno ni koristna, saj telo zopet pridobi začetno količino maščobe. Poseg ne izzove le večanja volumna že obstoječih maščobnih celic, ampak tudi tvorbo novih adipocitov iz progenitorskih celic (Faust in sod., 1977).

Vse več pozornosti je pri znanstvenikih deležna stromalna vaskularna celična frakcija (SVF). Pojem SVF se nanaša na celice, ki jih pridobimo po končani razgradnji lipoaspirata s kolagenazo, zato se v tej frakciji nahajajo stromalne celice, ki se sicer nahajajo v lipoaspiratu - ASC, preadipociti, endotelijske celice, periciti, gladke mišične celice, makrofagi in fibroblasti (Schäffler in Büchler, 2007).

Raziskave kažejo na sposobnost diferenciacije ASC v celice mezodermalnega izvora, kamor sodijo adipogene, hondrogene, osteogene, miogene in kardiomiogene linije. Nekaj raziskav pa kaže tudi na sposobnost diferenciacije v celične linije endo in ektodermalnega izvora, kamor prištevamo nevrone in Schwannove celice, hepatocite, pankreatične in endotelijske celice (Schäffler in Büchler, 2007).

Metabolične karakteristike vsakega tipa maščobe so odvisne od mesta nahajanja (anatomski del telesa). Bela in rjava maščoba se med seboj precej razlikujeta. Razlike so v številu ASC, ki jih lahko izoliramo, ter v fenotipu le-teh (Avram in sod., 2005). Belo maščevje je bogat vir multipotentnih MC, število in diferenciacijski potencial le-teh sta v rjavi maščobi precej manjša (Prunet-Marcassus in sod., 2006). Dokazali so, da celice iz WAT hitreje rastejo (Tchkonina in sod., 2006). Opazna je bila tudi razlika v diferenciacijskem potencialu, saj so matične celice bele maščevja v osteogenem mediju pokazale boljši rezultat (Prunet-Marcassus in sod., 2006). ASC iz visceralne maščobe imajo sicer nižjo sposobnost proliferacije, a večji diferenciacijski potencial kot tiste iz podkožnega tkiva (Tchkonina in sod., 2006). Značilna je tudi razlika v površinskih markerjih in to kaže na možnost obstoja dveh različnih populacij matičnih celic znotraj maščevja (Avram in sod., 2005). Dokazano je bilo tudi, da ASC pridobljene iz istega tipa maščobe (npr. iz WAT) ne kažejo enakih lastnosti, ampak se razlikujejo glede na anatomske predel, od koder so izolirane (trebuh, boki) (Rada in sod., 2009).

Maščobno tkivo ima torej večjo vlogo kot so mu jo sprva pripisovali. Potrebni bo seveda še precej raziskav, da bomo bolje spoznali prednosti uporabe ASC, specifične karakteristike tkiva, razlike med tehničnim pridobivanjem maščobe pa tudi razlike v maščobi pridobljeni z različnih delov telesa.

2.3 MATIČNE CELICE IZ MAŠČOBNEGA TKIVA (ASC)

Zgodnje raziskave matičnih celic v maščobi so se začele leta 1992, ko so raziskovalci uporabili svinjsko maščobo, ki naj bi bila morfološko podobna strukturi humane maščobe. V mediju s heparinom in endotelijskim rastnim faktorjem so gojili celice stromalne vaskularne frakcije - SVF (Young in sod., 1992). Kasneje se je izkazalo, da so v maščobnem tkivu, natančneje v SVF frakciji, prisotne ASC. Hipotezo je potrdila uspešna adipogena, hondrogena, osteogena in miogena diferenciacija v pogojih *in vitro* ob prisotnosti linijsko specifičnih faktorjev (Zuk in sod., 2001).

Matične celice iz odraslega organizma predstavljajo perspektivno orodje v regenerativni medicini, vendar pa sta pred klinično uporabo bistveni dve stvari: vir celic ter sposobnost nadzora celične proliferacije in diferenciacije (Rada in sod., 2009). Kostni mozeg je dolgo veljal kot glavni vir matičnih celic za terapevtske namene. BMSC imajo namreč visok

diferenciacijski potencial, hkrati pa proces pridobivanja omogoča ohranjanje visoke stopnje viabilnosti (Rada in sod., 2009). Zaradi dokaj zahtevnega postopka pridobivanja, majhnega volumna kostnega mozga in posledično majhnega izplena, so začeli iskati nove vire MC (Locke in sod., 2009). Pozornost so usmerili v druga tkiva. Kot nov, potencialen vir MC se je izkazalo maščobno tkivo. V primerjavi z aspiracijo kostnega mozga je postopek pridobivanja maščobe manj invaziven, izplen ASC pa je večji zaradi večje količine pridobljenega tkiva (Gimble in sod., 2007).

V kasnejših raziskavah so odkrili, da imajo ASC kar nekaj prednosti pred BMSC. Gojenje je lažje, enostavnejše, rast je hitrejša pa tudi senescenca se pri ASC pojavi precej kasneje (Zuk in sod., 2001; Kern in sod., 2006). Na proliferacijo in diferenciacijske sposobnosti ASC vplivajo številni dejavniki, in sicer tip ter lokacija maščobnega tkiva, starost donorja, način pridobivanja oz. tip posega, pogoji gojenja ter gostota nasaditve. Pri mlajših donorjih je proliferacija boljša, diferenciacijske sposobnosti pa se z leti ohranijo. Poleg pogojev gojenja pa na podvojevalni čas in hitrost rasti pomembno vpliva tudi rastni medij ter število pasaj (Schäffler in Büchler, 2007).

Pri dolgotrajnem gojenju humanih ASC, npr. več kot 4 mesece, so opazili maligne transformacije (Rubio in sod., 2005). V vsaj enem laboratoriju so pri serijskem gojenju ASC zaznali > 30 % abnormalnost v kariotipu. Posledica implantacije teh celic v miš z oslabljenim imunskim sistemom je bila tvorba tumorjev. Dejstvo, da so se ti tvorili v polovici primerov, kaže na nujnost nadaljnjih raziskav manipulacije in gojenja ASC (Rubio in sod., 2005). Pred klinično uporabo ASC je torej nujno opraviti varnostne teste, analizo kariotipa ter tumorigene analize *in vitro* ter *in vivo*.

ASC za regeneracijo tkiva uporabljajo različne mehanizme. Na poškodovanem ali obolelem mestu lahko sproščajo citokine in rastne faktorje, ki tkivo stimulirajo k obnovi. Ti faktorji spodbudijo druge endogene matične celice, da pridejo do poškodovanega tkiva, ter pomagajo pri njihovi diferenciaciji. V gostitelju se s tem izoblikuje niša matičnih celic. Drugi mehanizem delovanja temelji na zagotavljanju antioksidantov oz. lovilcev prostih radikalov. S tem se odstranijo toksične substance, ki so se sprostile v bližino ranjenega tkiva, in celice lahko poskrbijo za obnovo (Gimble in sod., 2007).

Regeneracijo pa lahko spodbudimo tudi tako, da v obolelo tkivo vstavimo v ustrezno linijo diferencirane celice (Gimble in sod., 2007).

Potrebno je poleg avtolognih poudariti potencialno uporabo alogenskih ASC. Avtologne ASC imajo prednosti, saj so pacientove lastne celice in se zato ujemajo, so histokompatibilne, ni pomislekov glede infekcij. Uporaba alogenskih ASC pa ima tudi številne prednosti, saj uporaba avtolognih ni vedno mogoča. Nedavne študije podpirajo možnost alogenske transplantacije ASC. Raziskave v treh neodvisnih laboratorijih kažejo na to, da humane ASC v nasprotju s sveže izolirano frakcijo SVF po nekaj pasajah izražajo bistveno manj površinskih histokompatibilnih antigenov. Tudi kokultivacija z alogenskimi perifernimi krvnimi monociti ne sproži limfocitne reakcije (McIntosh in sod., 2006; Puissant in sod., 2005). Tako kot BMSC tudi ASC zavirajo imunoreakcije. To nakazuje na dejstvo, da ASC tudi *in vivo* ne bodo sprožile citotoksičnega T-celičnega odgovora (McIntosh in sod., 2006; Puissant in sod., 2005). Če bodo to hipotezo potrdile tudi druge

neodvisne raziskave, se bo uporabnost alogenskih MC iz maščobe precej povečala, hkrati pa se bodo znižali stroški transplantacij. Z ozirom na dejstvo, da je v estetski kirurgiji liposukcija najpogostejši operativni poseg, pri katerem lahko naenkrat odstranimo več litrov maščobe, postaja vse bolj zanimiva in smiselna ideja o ustanovitvi biobank. Ljudje bi po opravljeni liposukciji svojo maščobo lahko altruistično darovali tako, kot sedaj darujejo kri krvodajalci.

2.3.1 Postopki izolacije

Maščobno tkivo lahko pridobimo z liposukcijo ali pa z izrezom tkiva. Z liposukcijo pridobljene maščobe pred obdelavo ni potrebno rezati na koščke, poleg tega pa študije kažejo, da je količina preadipocitov pridobljenih iz lipoaspirata večja kot pri izrezanem tkivu (Von Heimburg in sod., 2004; Huss in Kratz, 2002). Celice v lipoaspiratu najmanj poškodujemo z uporabo 2 ali 3 mm kanule in negativnim podtlakom, ki ga dosežemo s pomočjo 10 ml brizge. Večja kontaminacija lipoaspirata z drugimi tipi celic (endotelijske celice, fibroblasti, ...) predstavlja s stališča priprave ožiljenega tkivno-inženirskega pripravka dodatno prednost pred odrezanim kosom tkiva (Planat-Benard in sod., 2004; Scherberich in sod., 2007).

Število liposukcij nenehno narašča in pri vsakem posegu tako dobimo nekaj 100 ml do nekaj litrov maščobe. Gre za varno in preizkušeno metodo odstranjevanja odvečne maščobe, ki jo telo dobro tolerira. Zapleti so redki in se pojavijo v 0,1 % primerih (Hanke in Coleman, 1999). Liposukcija naj ne bi imela posebnega vpliva na celice, saj so dokazali, da je viabilnost le-teh v lipoaspiratu precej visoka, in sicer od 98 % do 100 % (Sommer in Sattler, 2000; Shiffman in Mirrafati, 2001). Varnost, pogostost in popularnost liposukcij kažejo na to, da je lipoaspirat idealen vir ASC za klinično uporabo (Locke in sod., 2009).

Metode izolacije ASC sta prva opisala Rodbell in Jones leta 1960, ki sta metodo preizkusila na podganjem maščobnem tkivu (Rodbell in Jones, 1966; Rodbell, 1966). Maščobo sta najprej sesekljala na drobne koščke, jih dobro sprala, da sta odstranila hematopoetske celice ter tkivo inkubirala z raztopino kolagenaze. S centrifugiranjem sta nerazgrajeno tkivo in zrele adipocite ločila od peleta celic. Postopek izolacije se je izpopolnjeval in v primeru človeške maščobe malo spremenil ter prilagodil (Deslex in sod., 1987).

Izolacijo MC iz maščobnega tkiva lahko izvedemo na več načinov. Najpogosteje uporabljena metoda, ki jo uporabljamo še danes, je encimska izolacija (Zuk in sod., 2001). Lipoaspirat po intenzivnem spiranju s PBS obdelamo s kolagenazo tipa I. Po inaktivaciji encima sledi centrifugiranje, s katerim se znebimo nerazgrajenega tkiva in prosto plavajočih lipidov. Dobljeni pelet resuspendiramo in filtriramo, da odstranimo še preostale nerazgrajene delce tkiva. Pri ponovnem centrifugiranju dobimo pelet celic oz. SVF (stromalna vaskularna frakcija), v kateri so poleg ASC še krvne celice, fibroblasti, periciti ter endotelijske celice (Zuk in sod., 2001). V kulturi želimo le ASC, zato je potrebno v zadnji stopnji narediti še večjo selekcijo med celicami. Pri tem izkoristimo eno izmed osnovnih lastnosti MSC, in sicer njihovo sposobnost pritrjevanja na plastiko. ASC se s pritrditvijo na dno gojilne posode same ločijo od ostalih celic, ki te sposobnosti nimajo (Gimble in sod., 2007).



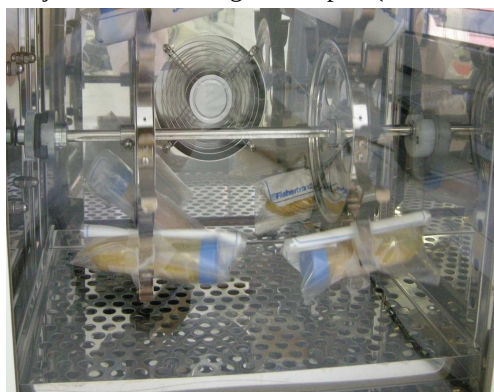
Maščobno tkivo – lipoaspirat (50 ml – 150 ml)



Spiranje s PBS (3 – 4 x)



Razgradnja z 0,075 % kolagenazo tipa I (30-60 min, T = 37 °C)



Inaktivacija kolagenaze



Centrifugiranje (10 min pri 1200 x g)

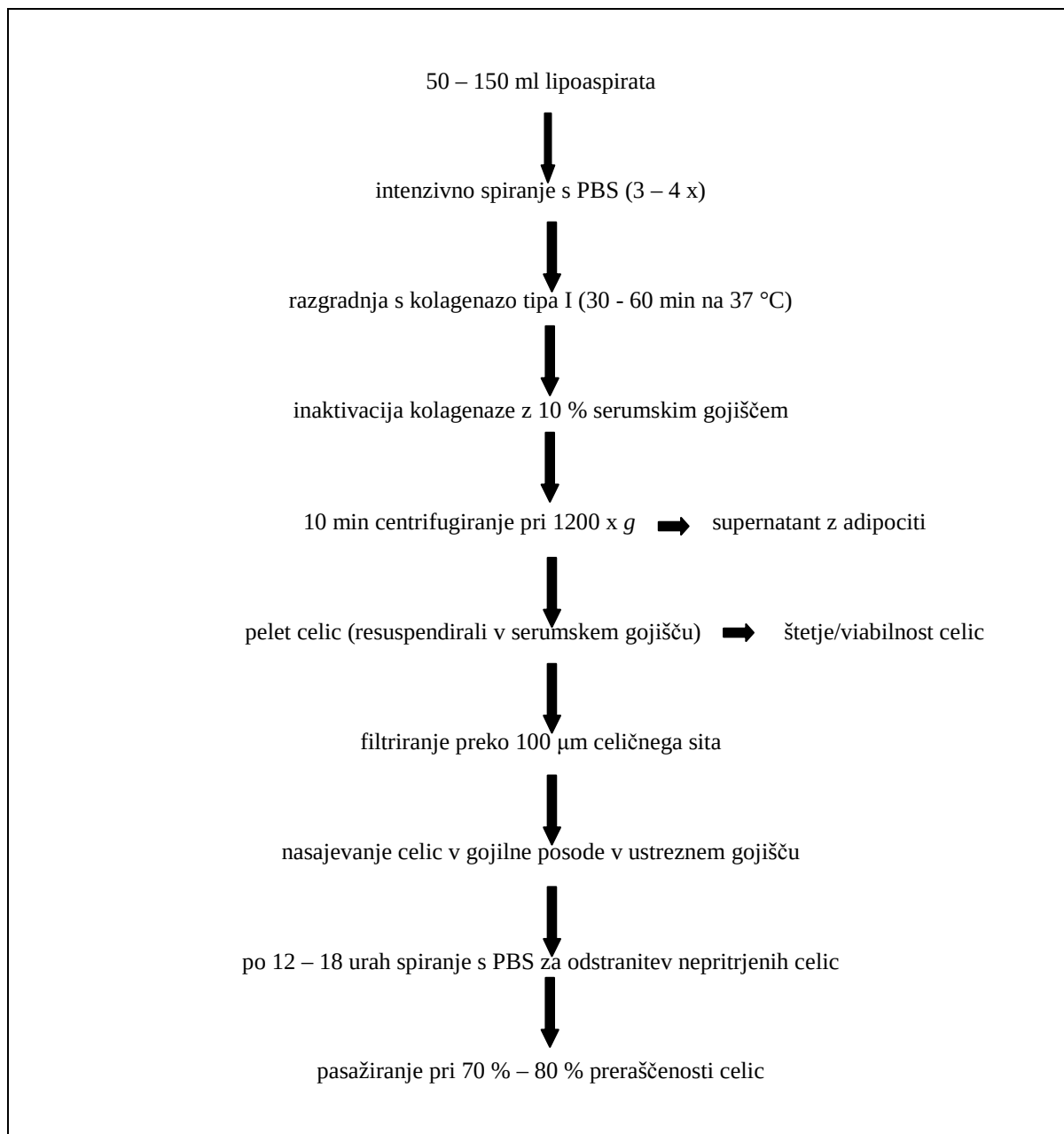


Nasaditev celic



Slika 1: Postopek izolacije ASC iz maščobnega tkiva - iz lipoaspirata

V spodnji shemi je naveden podrobnejši postopek izolacije ASC iz lipoaspirata.



Slika 2: Shema postopka izolacije ASC iz maščobnega tkiva (lipoaspirat)

Postopek izolacije ima poseben vpliv na viabilnost celic in na diferenciacijski potencial. Prav tako ne smemo zanemariti vpliva drugih faktorjev kot so starost donorja, tip tkiva (belo, rjavo), lokacija tkiva (subkutano, visceralno), način pridobivanja ter nenazadnje tudi pogoji gojenja (Schäffler in Büchler, 2007). Kot najboljši vir maščobnega tkiva za izolacijo ASC se je izkazala trebušna podkožna maščoba mlade, nedebele ženske (Barlič in Božikov, 2010).

2.4 KRIOPREZERVACIJA / ZAMRZOVANJE

Krioprezervacija je postopek shranjevanja celic in drugega biološkega materiala pri izjemno nizkih temperaturah. Tehnika omogoča dolgotrajno shranjevanje, saj pride do zaustavitve biokemijskih procesov, kar povzroči stabilizacijo celic (Simione, 1998).

Med zamrzovanjem pride do tvorbe kristalov, ki lahko usodno poškodujejo celico. Z uporabo krioprotektantov in upoštevanjem priporočene hitrosti zamrzovanja, precej zmanjšamo nastajanje škodljivih kristalov (Simione, 1998). Kot krioprotektante so preizkusili številne komponente (same ali v kombinaciji), med drugimi tudi sladkor, serum in topila. Kot najboljša sta se izkazala DMSO (dimetilsulfoksid) in glicerol. Krioprotektanti so najbolj učinkoviti, če preidejo v celico in tam zadržijo znotrajcelično zamrzovanje ter minimizirajo efekt zunajcelične raztopine. Da bi zmanjšali tveganje za kontaminacijo oz. ga preprečili, raztopino pripravimo tik pred uporabo ter jo steriliziramo. Za DMSO v ta namen uporabimo 0,2 μm filter, glicerol pa steriliziramo z avtoklaviranjem (121 $^{\circ}\text{C}$, 15 minut). Zaradi boljše penetracije DMSO v celici spodbudi večjo dehidracijo pred znotrajceličnim zamrzovanjem kot glicerol. Slabost DMSO-ja pa je njegova toksičnost, saj npr. v stiku s kožo preide v telo ter škoduje telesu. Glicerol in DMSO se uporabljata v koncentracijah 5 % - 10 %. Raztopljena sta v svežem rastnem mediju, saj to omogoča lepšo razporeditev celic po mediju, hkrati pa zmanjša toksične učinke. Nista uporabljena hkrati, izjema so le rastlinske celice (Simione, 1998).

Za čim boljšo ohranitev viabilnosti celic je torej bistvenega pomena tudi hitrost zamrzovanja. Ta namreč vpliva na hitrost formiranja kristalov in na velikost le-teh. Različne celice zahtevajo različne hitrosti ohlajanja, na splošno pa velja -1 $^{\circ}\text{C}$ / minuto. Večje celice so bolj občutljive na počasnejše ohlajanje, bakterije so bolj tolerantne. Rastlinske in živalske celice zahtevajo večji nadzor in kontrolo hitrosti ohlajanja, vključujoč posebne manipulacije za zmanjšanje škodljivih efektov ohlajanja. Večina prisotne vode zmrzne pri -2 $^{\circ}\text{C}$ do -3 $^{\circ}\text{C}$. Pri prehodu vode iz tekoče v trdno agregatno stanje, se sprosti energija v obliki toplote. Segrevanje poteka vse dokler ni dosežena ravnotežna točka, pri kateri se začne tvorba ledenih kristalov. Da bi zmanjšali škodljive efekte krioprezervacije na minimum, si pomagamo z umetno formacijo ledu oz. s hitrim znižanjem temperature.

Pri počasnem zamrzovanju se formacija ledu začne v ekstracelularnem prostoru. Voda se tako iz zunajceličnega prostora odstrani, pride do osmotskega neravnovesja in voda začne izhajati iz celice. To je za celice škodljivo. Če pa v celici ostane preveč vode, pride do tvorbe škodljivih kristalov znotraj celice in do rekristalizacije med odtajanjem. S počasnim zamrzovanjem dosežemo torej manj intracelularnega ledu in več osmolitskega ravnovesja, ki škodljivo vpliva na celice. Pri hitrem zamrzovanju pa se nakopiči več intracelularnega ledu, vpliv na osmotsko ravnotežje pa je manjši. Toleranca na hitro zamrzovanje je večja, če so celice bolj permeabilne. Največjo viabilnost celic dosežemo, če kot krioprotektanta uporabimo DMSO ali glicerol ter zamrzujemo s hitrostjo -1 $^{\circ}\text{C}$ /minuto (Simione, 1998).

Pred zamrzovanjem je potrebno celice ustrezno pripraviti. Optimalna gostota celic je 10^6 - 10^7 celic / ml zamrzovalnega medija. Energično pipetiranje ter centrifugiranje pri visoki hitrosti sta prepovedana. Pelet previdno resuspendiramo v zamrzovalnem mediju. Le

nežno, a hkrati učinkovito rokovanje s celicami zagotavlja zdrave in viabilne celice. Med mešanjem celic z zamrzovalnim medijem ter pričetkom zamrzovanja ne sme preteči več kot 60 minut. Priporočljivo je, da to izvedemo v 15 - 45 minutah. S podaljševanjem tega procesa namreč večamo toksičnost krioprotektanta za celice. V času, ko je mešanica na sobni temperaturi, pride do penetracije v celice. Če so celice, ki jih zamrzujemo, manj permeabilne, bi morali podaljšati ekvilibrijsko periodo - čas, ko je vzorec izpostavljen sobni temperaturi (Simione, 1998).

Cilj je doseči čimbolj enoten, kontroliran sistem ohlajanja. Cenovno ugoden in priročen način je, da vialo postavimo v zamrzovalnik na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ oz $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Da bi dosegli enotno hitrost ohlajanja, moramo vialo postaviti v posebno posodo za zamrzovanje celic - MrFrosty (Nalgene, ZDA). Ta omogoča in zagotavlja enakomerno nižanje temperature, zelo blizu $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Omogoča nam ohlajanje brez potrebe po direktni potopitvi v alkoholno kopel. S tem se zmanjša možnost kontaminacije (Simione, 1998).

Temperatura shranjevanja močno vpliva na dolžino in čas shranjevanja preparatov, vzorcev. Nižja ko je temperatura, daljši čas bodo celice lahko shranjene. Stabilnost celic je zagotovljena le, če jih vzdržujemo vsaj na $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za končno stabilnost živih celic je nujno shranjevanje v tekočem dušiku. Kljub temu tudi tu obstaja tveganje. Shranjevanje v tekočem dušiku je idealno, dokler je temperatura tudi pri odpiranju posode ostane blizu $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$. Da bi bilo shranjevanje ustrezno, moramo poskrbeti, da bo volumen tekočega dušika v posodi ustrezen. Zavedati se moramo, da vsaka sprememba v dvigu temperature, čeprav le za kratek čas, predstavlja nek vpliv in tveganje. Shranjevalna posoda mora biti temu prilagojena tako, da zmanjša izpostavitve višji temperaturi na minimum. Stojala znotraj zamrzovalnika omogočajo shranjevanje pri različnih temperaturah. Priporoča se, da se eno vialo v eno od zgornjih škattel, drugo vialo pa v eno od spodnjih škattel, saj je temperatura tam nižja in je zato možnost izpostavitve višji temperaturi manjša (Simione, 1998).

Pred ponovno uporabo moramo celice odmrzniti. Z razliko od zamrzovanja, moramo proces odtajanja izvesti čim hitreje, pri čemer jih prenesemo na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorci se sicer hitreje odtajajo v steklenih vialah, a so plastične boljše, saj pri njih ni bojazni, da bi med procesom počile. Pred ponovno nasaditvijo je za tako odmrznjene celične linije nujno 10 minutno centrifugiranje na $1200 \times g$, da odstranimo krioprotektante. Celice nato resuspendiramo v svežem mediju in jih nasadimo (Simione, 1998).

Kljub vsemu pa so nizke temperature za celice stres, zato ima krioprezervacija na njih negativen vpliv. Povzroči lahko strukturne in funkcionalne poškodbe proteinov in s tem reducira viabilnost celic. Imunofenotipske spremembe v celicah so komaj opazne (Gonda in sod., 2008). Najpomembnejše pa je, da celice kljub zamrznitvi ohranijo diferenciacijski in proliferacijski potencial. Kljub vzpodbudnim rezultatom pa se moramo zavedati dejstva, da bo krioprezervacijo potrebno še optimizirati (Gonda in sod., 2008).

Pri rokovanju in shranjevanju vzorcev v tekočem dušiku, je osebje izpostavljeno nizkim temperaturam, zato je nujna uporaba zaščitne obleke, izoliranih rokavic ter obraznega in vratnega ščitnika (Simione, 1998).

2.5 KLINIČNA UPORABA MATIČNIH CELIC IZ MAŠČOBE DANES IN V PRIHODNOSTI

Uporabo ASC v tkivnem inženirstvu upravičujejo številne lastnosti. ASC in BMSC so si sicer podobne tako po morfologiji kot tudi po transkripcijskem profilu, vendar imajo ASC določene prednosti. Rast je hitrejša, gojenje je lažje pa tudi postopek pridobivanja je precej manj invaziven kot pridobivanje aspirata iz kostnega mozga. Kljub velikemu potencialu pa je kliničnih aplikacij zaenkrat malo. V regenerativni medicini bi lahko z ASC zdravili različne defekte, poškodbe mehkih tkiv, kosti, hrustanca in mišic.

2.5.1 Zdravljenje in regeneracija mehkih tkiv

V današnji klinični praksi se za zdravljenje mehkih tkiv najpogosteje uporabljata 2 načina, in sicer transplantacija zrelih adipocit ter injeciranje s SVF obogatene maščobe. ASC, ki so v SVF frakciji, imajo namreč sposobnost diferenciacije v adipocite, hkrati pa spodbujajo angiogenezo – to je fiziološki proces tvorbe novih krvnih žil iz že obstoječih. Maščobno tkivo predstavlja glavno komponento tudi pri rekonstruktivni plastični kirurgiji in večjih defektih mehkih tkiv, kjer je največji problem povezan ravno z angiogenezo oz. z ožiljenjem ter z vzdrževanjem volumna nadomestka (Stosich in Mao, 2007).

Zanimanje za uporabo ASC v estetski kirurgiji je vedno večje. Aplikacije lipoinjiciranja so številne. Uporablja se ga lahko za prekrivanje znakov staranja ter pri popravilu neenakomerno razvitega obraza, kjer ena stran zaostaja v razvoju (hemifacial microsomia) (Coleman in Saboeiro, 2007).

Narašča tudi zanimanje za lepotno povečanje prsi z metodo CAL (angl. Cell Assisted Lipotransfer), ki je ena najmodernejših aplikacij ASC (Yoshimura in sod., 2008). Postopek izvedejo tako, da iz polovice pridobljenega avtolognega lipoaspirata izolirajo SVF ter z njim obogatijo drugo polovico, ki predstavlja naravni nosilec. S tem se izboljša vaskularizacija ter tako poveča možnosti za preživetje vsadka. V raziskavo je bilo vključenih 40 žensk (s povprečno starostjo 35,8 let), ki so jim s to metodo povečali prsi. Obogateno maščobo so injicirali na tarčna mesta. Opazili so minimalno postoperativno atrofijo, a ta po 2 mesecih ni bistveno napredovala. Skoraj vse pacientke so bile zadovoljne z mehkostjo in naravnostjo povečanih prsi, pri 4 pa so opazili tvorbo cist in mikrokalcifikacijo. CAL je uspešna in varna metoda. V telo ne vnašamo tujih materialov in se hkrati izognemo brazgotinam. Slabost je nepredvidljivost ter nizka stopnja preživetja nadomestka, saj pride do delne nekroze. Injiciranje avtologne maščobe je dobra alternativa umetnim nadomestkom (Yoshimura in sod., 2008).

2.5.2 Zdravljenje kostnih poškodb in defektov

Zaradi osteodiferencijskih sposobnosti predstavljajo ASC iz lipoaspirata potencial za zdravljenje zlomov, uporabili bi jih lahko kot kostne nadomestke. Zdravljenje z ASC je priporočljivo v primerih, ko človek ni sposoben reosifikacije obširnih poškodb. Prvi primer zdravljenja na človeku je bil objavljen leta 2004, ko so 7 letni deklici uspešno pozdravili defekt lobanjske kosti po hudi poškodbi glave. Rekonstrukcijo precej velike poškodbe so izvedli s kombinacijo avtologne spongiozne kosti (vzete iz črevnice) in ASC ter z uporabo

resorbilnega nosilca, ki so ga s pomočjo avtolognega fibrinskega lepila vstavili na mesto vrzeli. Po 3 mesecih je tomografija pokazala reosifikacijo poškodovanega mesta. Poseg se je izkazal kot varen in učinkovit (Lendeckel in sod., 2004).

Prvi klinični primer nastanka oz. tvorbe ektopične kosti iz ASC je leta 2009 opisala skupina znanstvenikov, ki je izvedla rekonstrukcijo defekta tkiv po hemimaksilektomiji (resekcija frontalne kosti). Uporabili so mikrovaskularni prosti reženj z ektopično kostjo v njem. Slednjo so vzgajali s pomočjo v prosti reženj vstavljenega konstrukta iz ASC, rastnega faktorja BMP-2 in celičnega nosilca. Po osmih mesecih se je iz konstrukta razvila zrela kost, prišlo je do ožiljenja in nadomestek so transplantirali na poškodovano mesto (Mesimäki in sod., 2009).

2.5.3 Zdravljenje gastroenteroloških bolezni

Na področju gastroenterologije potekajo zaključne faze kliničnih študij za zdravljenje kompleksnih perianalnih fistul, ki so posledica kronove bolezni ali drugih podobnih stanj. Leta 2003 so uspešno opravili 1. fazo klinične študije za zdravljenje kroničnih fistul z avtolognimi ASC. V 8 tednih so opazili popolno ozdravitev pri zadovoljivih 75 % pacientov. Ugotovili so, da je poseg varen in nima negativnih stranskih učinkov. V 2. fazi klinične študije so se posvetili predvsem preverjanju učinkovitosti. V raziskavo je bilo vključenih 50 pacientov v starosti od 33 do 62 let, ki so jih razdelili v dve skupini. Fistule kontrolne skupine so tretirali le s fibrinskim lepilom, pri testni pa so uporabili kombinacijo fibrinskega lepila in ASC (20×10^6 celic). Ko so po 8 tednih prvič preverjali uspešnost posega, je v testni skupini prišlo do izboljšanja v 46 % primerov, po ponovnem posegu pa pri 25 %. V kontrolni skupini so izboljšanje opazili le pri 8 % pacientov, tudi po drugi aplikaciji fibrinskega lepila, je bil učinek enak. Če po prvem pregledu namreč niso opazili izboljšanja, so posameznikom aplicirali še eno dozo fibrinskega lepila oz. fibrinskega lepila in ASC (vendar so pri tem uporabili še enkrat toliko celic kot prvič – 40×10^6 celic). Rezultati kažejo, da je učinek hkratnega apliciranja ASC in fibrinskega lepila bistveno večji in učinkovitejši. Glavni cilj 3. faze klinične študije, ki se je že začela, pa je podati končno oceno učinkovitosti ASC v zdravljenju kompleksnih perianalnih fistul (Garcia-Olmo in sod., 2009).

Trenutno naj bi po podatkih ameriškega Nacionalnega inštituta za zdravje (NIH; www.clinicaltrials.gov) na dan, 31.5.2010, potekalo 29 kliničnih študij z uporabo ASC, med drugim tudi za zdravljenje jetrne ciroze, diabetesa (tip 1 in 2) ter kardiovaskularnih bolezni (kronična ishemija miokarda, zdravljenje pacientov po preboleli srčni kapi).

Za boljše poznavanje prednosti in slabosti uporabe ASC, bo potrebnih še ogromno raziskav. Nedavne raziskave so namreč pokazale, da se ASC gojene pri normalnih pogojih v daljšem obdobju lahko transformirajo v rakave celice (Rubio in sod., 2005; Rubio in sod., 2008). Enak pojav so opazili tudi pri embrionalnih matičnih celicah (EMC). Glede na to, da MC iz maščobe izražajo gene, ki so tipični za EMC, je logično, da predpostavimo, da imajo ASC nekatere podobne karakteristike kot EMC vključno z mutageno aktivnostjo (Peroni in sod., 2008). Le dodatne raziskave in študije bodo omogočile koristno, varno in učinkovito uporabo ASC v medicini (Rada in sod., 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 LABORATORIJSKA OPREMA, MATERIAL, KEMIČALIJE IN GOJIŠČA

3.1.1 Laboratorijska oprema

Preglednica 2: Seznam uporabljene laboratorijske opreme

LABORATORIJSKA OPREMA	PODJETJE
centrifuga, 5804R	Eppendorf, Nemčija
CO2 inkubator HeraCell	Hermo/Fischer Scientific
hibridizacijski inkubator	GFL, Nemčija
rotacijski stresalnik, vortex, MS2 Minishaker	IKA, ZDA
zaščitna mikrobiološka komora	HetoHolten, Danska
pipetor za pipete, Pipetboy	INTEGRA Biosciences, Švica
grelni blok	Biometra, Nemčija
hladilnik (+4 C)	Electrolux, Švedska
zamrzovalnik (-20 C)	Electrolux, Švedska
zamrzovalnik (-80 C)	HetoHolten, Danska
posoda s tekočim dušikom	LocatorPlusJr., Barnstead/Thermolyne Corporation, ZDA
tehtnica	Scaltec Instruments, Nemčija
invertni mikroskop	Nikon, Japonska
MrFrosty – posoda za počasno zamrzovanje celic	Nalgene, ZDA

3.1.2 Material

Preglednica 3: Seznam uporabljenega materiala

MATERIAL	PROIZVAJALEC
celična sita (100 µL)	Falcon, ZDA
števna komora, Fast-Read 102,	ISL, Velika Britanija
injekcijske brizge 2,5 ml, 20 ml in 50 ml	Icogamma, Novico Med., Španija
mikrocentrifugirke	Costar, ZDA
gojilne posode s 6, 12 in 24 vdolbinicami (6, 12. in 24-WELL)	TPP, Švica
gojilne posode, 25 cm, 75 cm	TPP, Švica
sterilizacijski filter Minisart 0,2 µm	Sartorius, Nemčija
pipete za enkratno uporabo (1, 5, 10, 25, 50 in 100 ml)	TPP, Švica
pipete za enkratno uporabo (2 ml)	Costar, ZDA
stojalo za centrifugirke	TPP, Švica
čase	
urinski lončki	
skalpel	Aesculap, ZDA
strgalo (scraper)	TPP, Švica
tipsi (1-10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Costar, ZDA
škafle za zamrzovanje v tekočem dušiku	
krpice z detergentom	Shield Medicare, Velika Britanija
biocidne krpice	Shield Medicare, Velika Britanija

3.1.3 Kemikalije

Preglednica 4: Seznam uporabljenih kemikalij

OKRAJŠAVA	CELO IME	PODJETJE
D-MEM/F12	Dulbeccovo modificirano gojišče ("Dulbecco's Modified Eagle Medium")	Gibco, ZDA
HBSS	Hanksova ozmolarna raztopina soli	Gibco, ZDA
PBS	fosfatni pufer ("Phosphate Buffered Saline")	
humani serum		ZTM, Slovenija
kolagenaza I		Gibco, ZDA
tripansko modrilo		Gibco, ZDA
DMSO	dimetil sulfoksid ("dimethyl sulfoxide")	Sigma, ZDA
tripsin	tripsin z EDTA	Sigma, ZDA
gentamicin		Gibco, ZDA
izopropanol (za MrFrosty)		Sigma-Aldrich, Nemčija
3,7 % formaldehid		Merck, Nemčija
2 % Ag-nitrat		
Mayerjev hematoksilin		Fluka, Švica
Red Oil O		Sigma, ZDA
70 % etanol		Shield Medicare, Velika Britanija
biocid		Shield Medicare, Velika Britanija
tripsinski inhibitor		Gibco, ZDA

3.1.4 Gojišča in raztopine

Gojilni medij za ASC:

- D-MEM/F-12,
- 10 % humanega seruma,
- 1 µl/ml gentamicina.

AIM – adipoindukcijsko gojišče:

- 10 % humanega seruma + 90 % D-MEM HG (z visoko vsebnostjo glukoze) + 50 µg/ml gentamicina,
- 2 mM L-glutamin,
- 10 µg/ml inzulina,
- 1 µM deksametazon,
- 100 µM indometacin,
- 500 µM IBMX.

Osteoindukcijsko gojišče – OSTEO CAMBEX (narejeno po navodilih proizvajalca):

- osteogeno gojišče (Cambrex, ZDA),
- 20 µL/ml L-glutamina,
- gentamicin,
- askorbinska kislina,
- deksametazon,
- beta glicerofosfat,
- 2,5 % oz. 5 % humani serum.

Kontrolno gojišče – adipo-indukcija:

- D-MEM/LG (z nizko vsebnostjo glukoze),
- 10 % humanega seruma,
- 50 µg/ml gentamicina.

Kontrolno gojišče – osteo-indukcija:

- D-MEM/F-12,
- 2,5 % oz. 5 % humanega seruma,
- 50 µg/ml gentamicina.

Raztopina za inaktivacijo tripsina:

- D-MEM/F-12,
- 0,25 mg/ml tripsinski inhibitor.

Gojilni medij za inaktivacijo kolagenaze:

- D-MEM/F-12,
- 10 % humanega seruma.

Zamrzovalni medij:

- 90 % humanega seruma,
- 10 % DMSO.

Raztopina kolagenaze:

- 0,075 % kolagenaze tipa I v D-MEM/F-12.

Raztopino kolagenaze za razgradnjo pripravimo v 50 ml centrifugirki, jo za 10 minut postavimo v termoblok na $T = 37^{\circ}\text{C}$ ter pred uporabo sterilno prefiltriramo.

Založna raztopina Red Oil O:

- 0,1 g Red Oil O,
- 100 ml izopropanola.

Raztopino segrejemo v vodni kopeli pri 56°C 30 – 60 minut, da se barvilo popolnoma raztopi. Hranimo ga v dobro zaprti posodi pri sobni T.

Delovno raztopino Red Oil O pripravimo tako, da založni raztopini dodamo destilirano vodo v razmerju 1,5 : 1. Redčino pustimo stati 10 minut pri sobni T, nato filtriramo.

3.2 METODE

3.2.1 Potek poskusov

Vzorci lipoaspiratov, iz katerih smo izolirali SVF, smo dobili v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, in sicer na Kliničnem oddelku za plastično, rekonstrukcijsko, estetsko kirurgijo in opekline. Za pridobitev tkiva smo pridobili soglasje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko – KME (št. 21/09/07). Pacienti so se strinjali z darovanjem tkiva v raziskovalne namene in to potrdili s podpisom izjave o privolitvi. Z liposukcijo pridobljeno tkivo je najbolje obdelati še isti dan ali pa ga čez noč shraniti v hladilniku (+ 4 °C). Po izolaciji stromalne vaskularne frakcije (SVF) smo matične celice prešteli ter jih polovico nasadili (nasaditvena gostota je bila 100.000 celic/cm²). Drugo polovico frakcije pa smo za 1 mesec zamrznili v tekočem dušiku. Da bi odstranili eritrocite in nepritrjene celice, smo primarno kulturo naslednji dan spirali s filtriranim PBS ter zamenjali gojilni medij. Spremljali smo rast in ob doseženem 70 % - 90 % konfluenci izvedli tripsinizacijo. Štetju je sledila nasaditev prve pasaže. Ob ponovno doseženem konfluentnem stanju, smo zopet izvedli tripsinizacijo in štetje.

V naslednjem koraku smo začeli z diferenciacijo ASC v adipogeno in osteogeno celično linijo. Celice prve pasaže smo po končanem štetju torej razdelili:

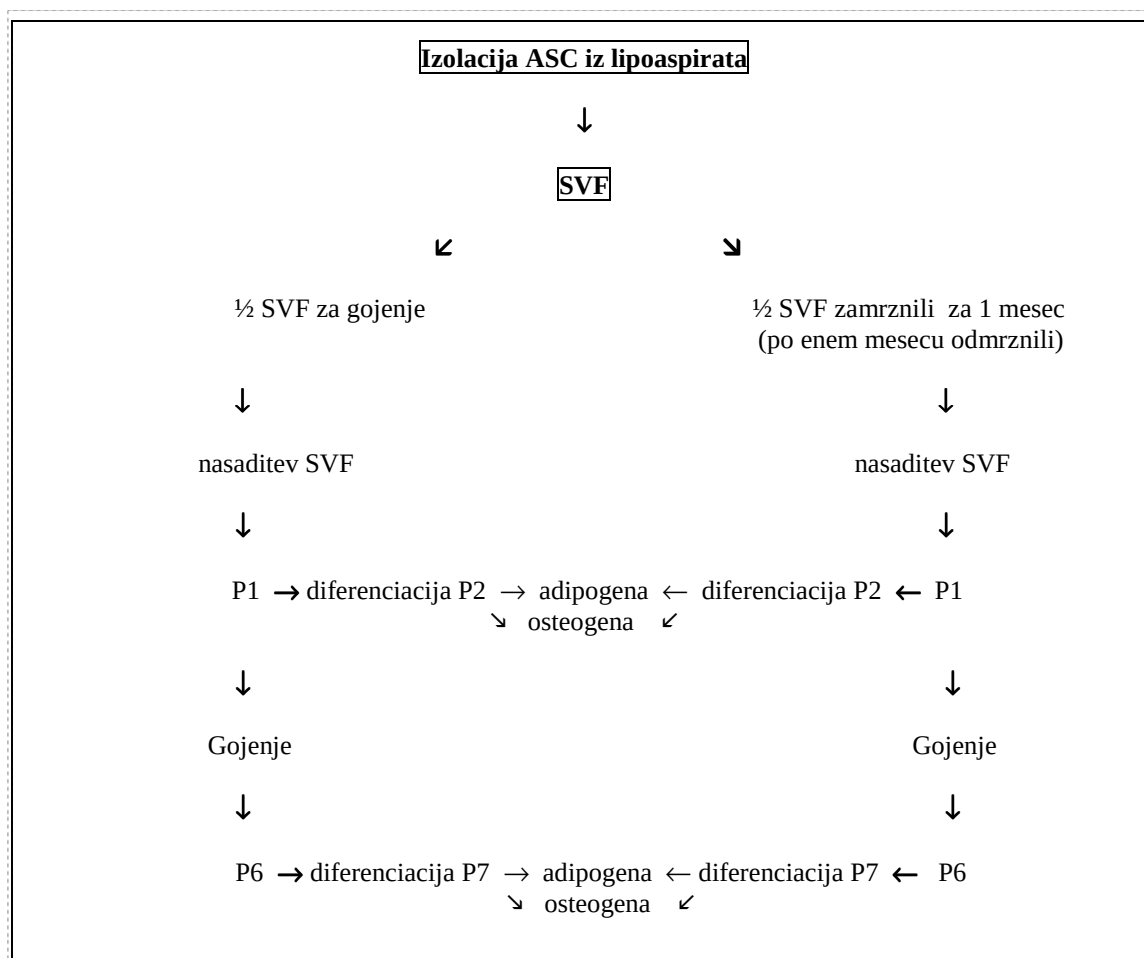
- del celic smo namenili za indukcijo v osteogeno in adipogeno linijo,
- drugi del smo nasadili naprej (nasaditvena gostota je bila 5.000 celic/cm²), jih gojili do šeste pasaže ter jih ponovno inducirali,
- ostanek pa smo zamrznili v tekočem dušiku.

Nasaditvena gostota za indukcijo celic v osteogeno linijo je 5.000 celic/cm². Indukcija v adipogeno linijo pa zahteva večjo gostoto nasaditve, in sicer 20.000 celic/cm². Te celice smo gojili v osteo- in adipoindukcijskem mediju ter jim 2 – 3 krat tedensko menjali gojišča. Adipogeno linijo smo barvali po 10 dneh indukcije, osteogeno pa po 21. oz. po 26. dnevni in dokazali morebitno uspeho oz. neuspeho diferenciacije v zeleno linijo. Indukcijo smo po enakem postopku izvedli tudi s celicami šeste pasaže.

Ker je bil naš namen preveriti tudi vpliv krioprezervacije na sposobnost diferenciacije in razmnoževanja ASC, smo zamrznjene celice oz. SVF po enem mesecu odmrznili ter celoten postopek gojenja ter indukcije druge in sedme pasaže ponovili.

Sledila je primerjava rezultatov oz. uspešnosti diferenciacije ter proliferacije med svežimi in zamrznjenimi vzorci. Izračunali smo tudi kumulativno populacijskega podvojevanja od prve do šeste pasaže.

Pred delom smo morali vse raztopine in gojišča, s katerimi so celice prihajale v stik, sterilno filtrirati ter paziti, da je bila temperatura le-teh blizu 37 °C, saj smo tako preprečili temperaturni šok.



Slika 3: Shema poteka postopkov od izolacije SVF do končne diferenciacije

3.2.2 Potek gojenja matičnih celic in diferenciacija

3.2.2.1 Izolacija SVF iz maščobnega tkiva in priprava primarne kulture

Transportni lonček oz. vrečko z maščobnim tkivom smo postavili v zaščitno mikrobiološko komoro. Tkivo smo prenesli v veliko čašo ter začeli z intenzivnim spiranjem s PBS, da bi odstranili kri. Količina dodanega PBS je bila približno enaka volumnu vzorca. Po previdnem mešanju smo s 50 ml pipeto odpipetirali spodnjo tekočo fazo. Spiranje smo ponovili 3 – 4 krat ter na koncu odčitali volumen spranega lipoaspirata. Razdelili smo ga v 50 ml centrifugirke (po približno 25 ml). V vsako centrifugirko smo dodali še približno 16 ml 0,075 % raztopine kolagenaze tipa I za razgradnjo (glej točko 3.1.4 Gojišča in raztopine), jih namestili v hibridizacijski inkubator in začeli z inkubacijo, ki je ob rahlem vrtenju potekala 30 – 60 minut pri $T = 37^{\circ}\text{C}$.

Po končani inkubaciji smo vsebino vseh centrifugirk v zaščitni mikrobiološki komori zlili v skupno čašo in kolagenazo inaktivirali z gojilnim medijem z 10 % humanim serumom

(glej točko 3.1.4 Gojišča in raztopine). Pomembno je, da sta volumen raztopine kolagenaze in volumen medija za inaktivacijo enaka. Če torej za razgradnjo uporabimo 100 ml raztopine kolagenaze, jo moramo inaktivirati s 100 ml serumskega gojišča.

Po inaktivaciji smo maščobo zopet razdelili v centrifugirke, ki smo jih tokrat napolnili do vrha. Sledilo je 10 minutno centrifugiranje pri 1200 x *g*. Supernatant, v katerem so bili zreli adipociti, je predstavljal odpadke, zato smo ga zelo previdno odlili, pelet pa resuspendirali v 1ml gojilnega medija. Celično suspenzijo iz vsake centrifugirke smo s transfer pipeto počasi prenesli na celično sito s premerom por 100 µm v skupno 50 ml centrifugirko, ki smo jo primerno označili. Prazne centrifugirke smo sprali z gojilnim medijem ter vsebino zlili na sito. Izmerili smo skupni volumen in prešteli celice (glej točko Štetje celic s števno komoro). Polovico celic smo nasadili, preostanek pa za en mesec zamrznili. Upoštevali smo, da je optimalna gostota za nasajanje primarne kulture 100.000 celic/cm². Glede na število celic smo izbrali primerno veliko gojilno posodo (navadno 6-well) in jo postavili v CO₂ inkubator.

3.2.2.2 Spiranje celic primarne kulture

Heterogena SVF frakcija vsebuje poleg ASC še eritrocite in številne druge celice, ki se ne prilepijo na dno posode in jih želimo odstraniti. Matične celice se zelo hitro primejo na podlago, že v roku ene ure po nasaditvi se jih pritrdi ogromno. Kljub temu pa je priporočljivo, da se spiranje izvaja po 12 – 20 urah inkubacije, zato smo po nasaditvi primarno kulturo čez noč postavili v CO₂ inkubator na 37 °C. Naslednji dan smo odstranili izrabljeno gojišče, sledilo je spiranje s PBS. Uporabili bi lahko tudi DMEM ali HBSS. Z dodatkom poljubnega volumna izbrane raztopine (količina je odvisna od velikosti gojilne posode) in s primerno intenzivnim mešanjem pokrite gojilne posode, smo odstranili eritrocite, mrtve celice in tiste, ki se niso pritrdile. Uspešnost in stanje smo preverjali pod mikroskopom. Včasih je bilo dovolj trikratno spiranje, včasih pa tudi po šestkratnem spiranju rezultat ni bil zadovoljiv in smo še vedno opazili eritrocite. Ko smo bili z rezultatom zadovoljni, smo dodali svež gojilni medij ter posodo vrnili v inkubator.

3.2.2.3 Dohranjevanje celične kulture

Rast celic smo spremljali vsak dan ter jim 2 – 3 krat tedensko zamenjali gojilni medij (glej sestavo pod točko 3.1.4 Gojišča in raztopine). Menjavo smo izvedli tako, da smo izrabljeno gojišče odstranili ter dodali ustrezen volumen svežega.

Gojišče je v hladilniku pri T = 4 °C uporabno 1 teden, nato pripravimo novega. Lahko ga naredimo več, ga alikvotiramo in shranimo v zamrzovalniku pri temperaturi – 20 °C. Pred uporabo gojišče sterilno prefiltriramo.

3.2.2.4 Tripsinizacija

Tripsinizacija je postopek odlepljanja celic enoslojne kulture z dna gojilne posode s pomočjo encima tripsina. Potrebo po tripsinizaciji ocenimo glede na preraščenost gojilne posode. Najugodnejši čas za presaditev celic v novo, večjo posodo je, ko le-te dosežejo 70 % - 90 % konfluenco oz. preraščenost.

Iz gojilne posode s celicami najprej odstranimo izrabljen gojilni medij. Sledi dvakratno 15 sekundno spiranje pritrjenih celic s HBSS ob počasnem, rahlem mešanju. Gojišče je potrebno pred tripsinizacijo namreč dobro sprati, saj serum v gojišču inhibira delovanje tripsina. Odstranimo HBSS ter dodamo ustrezen volumen (glej Preglednico 5) tripsina (0,5 % raztopina tripsin/EDTA) ter posodo za 3 minute postavimo v inkubator na 37 °C. Po inkubaciji preverimo stanje pod mikroskopom in ocenimo ali je bila inkubacija dovolj dolga. V primeru, da se celice niso odlepile, jih za 1 minuto postavimo nazaj v inkubator ali pa posodo na vorteksu rahlo stresemo. Celic v tripsinu ne smemo pustiti dlje kot 10 minut. Ko se odlepijo od dna, celično suspenzijo odpipetiramo v 15 ml centrifugirko. Delovanje tripsina ustavimo z dodajanjem dvakratnega volumna tripsinskega inhibitorja, s katerim tudi speremo gojilno posodo. Alternativno tripsinskemu inhibitorju predstavlja 20 % serumski gojilni medij. Suspenzijo centrifugiramo 5 minut na 400 x *g* pri sobni temperaturi. Supernatant odlijemo, pelet pa resuspendiramo. Pripravimo si vzorčke za štetje. Po končanem štetju celice nasadimo.

Preglednica 5: Razmerje med velikostjo posode in volumnom uporabljenih kemikalij pri tripsinizaciji

Površina GP (gojilne posode)	Količina HBSS	Količina TRIPSINA	Količina TRIPSINSKEGA INHIBITORJA	Količina GOJIŠČA
25 cm ²	4 ml	1 - 3 ml	6 ml	4 ml
75 cm ²	12 ml	3 - 6 ml	12 ml	12 ml
150 cm ²	15 ml	6 - 8 ml	16 ml	20 ml
300 cm ²	25 ml	8 - 10 ml	20 ml	40 ml

3.2.2.5 Štetje celic s števno komoro

Po vsaki izolaciji iz lipoaspirata in po vsaki tripsinizaciji celice preštujemo. Celično suspenzijo pred vzorčenjem dobro premešamo, da postane homogena. Odpipetiramo 20 µL vzorca in mu dodamo enak volumen raztopine tripsinskega modrila. Da bi zmanjšali možnost napak pri štetju, navadno vzamemo 3 vzorce in izvedemo 3 ponovitve štetja. Z nežnim pipetiranjem mešanico modrila in celic pred nanosom dobro premešamo, nanesemo na števno ploščico in začnemo s štetjem. Med nanosom posameznih vzorčkov menjamo tipse. Preštujemo žive celice v vseh treh prekatih. Tripsansko modrilo je barvilo, ki lahko preide le v mrtve celice, ki se zato obarvajo modro. Vsoto živih celic vseh treh vzorčkov smo delili s 30 (v posameznem števnem prekatu je 10 kvadratkov) in dobili povprečno število živih celic v kvadratu. Iz števila prešteti živih celic smo po spodnji enačbi izračunali celokupno število živih celic v celični suspenziji:

$$N = n \times R \times V \times 10^4 \quad \dots (1)$$

N – število živih celic v suspenziji

n – povprečno število prešteti celic v kvadratu $((n_1 + n_2 + n_3)/30)$

R – faktor redčenja zaradi mešanja s tripsanskim modrilom

V – volumen celične suspenzije, iz katere smo odvzeli vzorec

3.2.2.6 Nasaditev celic v prvo pasažo

Glede na število celic, ki so nam na razpolago, se odločimo, v kako veliko posodo bomo nasadili celice. V našem primeru je bila to največkrat gojilna posoda s površino 25 cm². Za to velikost posode je bilo potrebnih 125.000 celic, saj je nasaditvena gostota 5.000 celic/cm². MC smo torej resuspendirali v 4 ml gojišča ter jih nasadili v GP 25 cm².

3.2.2.7 Populacijsko podvojevanje

Populacijsko podvojevanje (PD) je število podvojitvev celične linije vse od začetka gojenja v pogojih *in vitro*. Populacijska podvojitvev nam torej pove, koliko celic dobimo iz ene same celice. Izračunamo jo za vsako pasažo posebej ($P_0 \rightarrow P_6$) s pomočjo spodnje formule (Cristofalo in sod., 1998).

$$PD = [\log_{10}(N_H) - \log_{10}(N_Z)] / \log_{10}(2) \quad \dots (2)$$

PD = populacijsko podvojevanje

N_Z = začetno število nasajenih celic

N_H = izplen oz. pridobljeno število celic

S seštevanjem posameznih vrednosti PD pa smo nato izračunali še kumulative populacijskega podvajanja za posamezno pasažo.

Zanimalo nas je, kako so zamrznjene celice ohranile sposobnost proliferacije, zato smo poleg izračuna vrednosti PD in kumulative populacijskega podvojevanja narisali tudi grafe ter primerjali rezultate med nezamrznjenimi in zamrznjenimi celicami.

3.2.2.8 Diferenciacija matičnih celic iz lipoaspirata v adipogeno in osteogeno linijo

Ob doseženi 70 % – 90 % konfluenci celično kulturo tripsiniziramo in celice preštejemo. Upoštevati moramo, da je nasaditvena gostota za osteoindukcijo 5.000 celic/cm². Posodo preko noči postavimo v inkubator, da se celice pritrldijo, naslednji dan pa medij zamenjamo z osteogenim (glej sestavo pod točko 3.1.4 Gojišča in raztopine). Za prvi dve menjavi uporabimo osteogeno gojišče s 5 % serumom, pri naslednjih menjavah pa koncentracijo seruma zmanjšamo na 2,5 %. Celice v kontroli gojimo v navadnem gojilnem mediju, pri čemer odstotek seruma ustreza koncentraciji v indukcijskem gojišču.

Pri adipogeni indukciji je zadeva podobna. Za razliko od osteogene indukcije, adipogena zahteva večjo nasaditveno gostoto, in sicer 20.000 celic/cm². Posodo preko noči postavimo v CO₂ inkubator, naslednji dan pa medij zamenjamo z adipogenim (glej točko 3.1.4 Gojišča in raztopine). Med 10-dnevno indukcijo, na vsake 3 dni zamenjamo gojišče, a deleža seruma ne spreminjamo. Celice v kontroli gojimo v 10 % serumskem gojišču v D-MEM-LG.

3.2.2.9 Krioprezervacija ali shranjevanje celic v tekočem dušiku

Celice, ki jih po izolaciji oz. po tripsinizaciji nismo potrebovali za nadaljnje poskuse, smo zamrznili v tekočem dušiku. Ugotovili smo skupno število celic v suspenziji ter se odločili, koliko jih želimo zamrzniti v posamezni krioviali. Ustrezne volumne celične suspenzije smo nato razdelili v centrifugirke ter jih pri sobni temperaturi 5 minut centrifugirali pri 400 x g. Previdno smo odlili supernatant ter peletu ob steni centrifugirke počasi (zaradi toksičnega vpliva DMSO na celice) in previdno dodajali zamrzovalni medij. Volumen dodanega medija je odvisen od števila celic (Preglednica 6). Mešanico smo prenesli v ohlajene krioviale za zamrzovanje, jih dali v posodo za počasno zamrzovanje (MrFrosty) to pa v čez noč pustili v zamrzovalniku na -80°C . Naslednji dan smo krioviale prenesli v posodo s tekočim dušikom (-196°C).

Preglednica 6: Količina dodanega zamrzovalnega medija v odvisnosti od števila celic

ŠTEVILO CELIC	KOLIČINA ZAMRZOVALNEGA MEDIJA
100.000 - 500.000 celic	0,5 ml zamrz. medija
500.000 - 1.000.000 celic	1 ml zamrz. medija
1.000.000 - 10.000.000 celic	1,5 - 1,8 ml zamrz. medija

3.2.2.10 Odmrzovanje

Kriovialo za zamrzovanje s SVF frakcijo vzamemo iz posode s tekočim dušikom. Med odtajanjem celicam s pipeto postopno dodajamo sterilno filtriran humani serum ter jih prenašamo v novo 50 ml centrifugirko. Le s hitrim odtajanjem preprečimo toksično delovanje dimetilsulfoksida (DMSO). Celicam nato dodamo 10 ml gojilnega medija ter z njim speremo tudi kriovalo. S 5 minutnim centrifugiranjem pri 400 x g celice ločimo od toksičnega krioprotektivnega sredstva. Pelet resuspendiramo v nekaj ml gojilnega medija ter pripravimo vzorčke za štetje.

3.2.3 Karakterizacija diferenciacije v adipogeno in osteogeno linijo

Da bi preverili uspešnost diferenciacije ASC v adipogeno linijo, smo celično kulturo barvali z barvilom Red Oil O. Za dokazovanje diferenciacije v osteogeno linijo pa smo izvedli barvanje von Kossa.

3.2.3.1 Barvanje Red Oil O

Med procesom diferenciacije v maščobne celice se v citoplazmi ASC začnejo kopičiti maščobne kapljice, ki se s časoma zlivajo v večje. Zrela maščobna celica vsebuje pretežno maščobo, ki jo obdaja le tanka plast citoplazme.

Pred barvanjem smo odstranili gojišče ter celice dvakrat sprali s PBS oz. s HBSS. Po 10 minutni fiksaciji celične kulture v 3,7 % formaldehidu smo celice sprali z destilirano vodo in jih 10 minut inkubirali v Mayerjevem hematoksilinu. Sledilo je nekajkratno

spiranje z destilirano vodo ter 5 – 10 minutna inkubacija v Red Oil O (lipofilno barvilo, ki se v celicah veže na lipidne vakuole in jih obarva rdeče). Celice smo ponovno sprali, preparat pogledali pod mikroskopom ter fotografirali.

3.2.3.2 Barvanje von Kossa

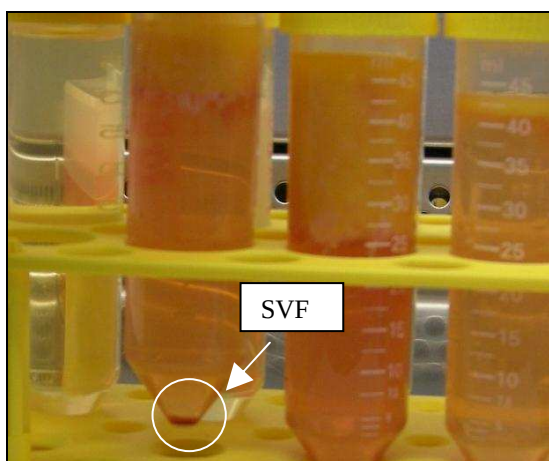
Diferencirani osteociti (zrele kostne celice) izločajo v matriks poleg kolagena I in nekaterih drugih proteinov tudi veliko kalcijevega fosfata, ki se nahaja v obliki kristalov hidroksiapatita in daje kostnini trdnost in togost. Za dokazovanje prisotnosti kalcijevega fosfata in karbonata se uporablja von Kossa barvanje (srebrova redukcijska metoda). Srebro v srebrovem nitratu nadomesti kalcij v kalcijevi soli. Srebrova sol pod vplivom svetlobe reducira in izloči se srebrova kovina, ki je temne barve.

Pred pričetkom barvanja smo odstranili gojišče ter celice dvakrat sprali z mrzlim HBSS. Po 30 minutni fiksaciji celične kulture v 3,7 % formaldehidu smo celice dvakrat sprali z destilirano vodo. Dodali smo raztopino 2 % srebrovega nitrata ter gojilno posodo 10 minut inkubirali v temi. Sledilo je trikratno spiranje z vodo, pri čemer smo vodo tretjega spiranja pustili na celicah ter jih za 15 – 30 minut izpostavili močni svetlobi (lahko tudi UV lučki). Celice smo nato še dvakrat sprali z vodo, preparat pregledali pod mikroskopom ter fotografirali. Ker se torej srebrov nitrat pod vplivom močne svetlobe naloži na kalcijeve depozite, zaradi obarvanja pa kalcijeve depozite vidimo kot kovinsko srebro.

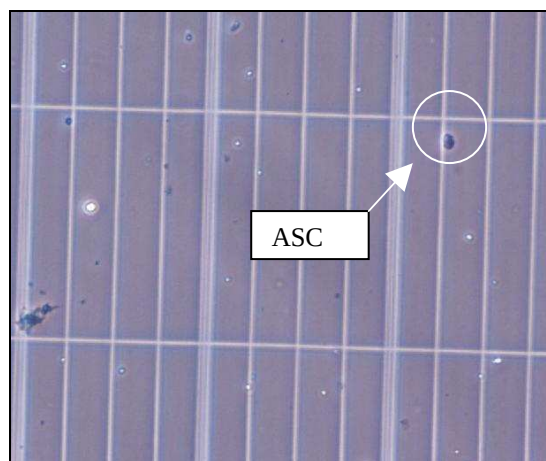
4 REZULTATI

4.1 MORFOLOGIJA ASC GOJENIH V MONOSLOJNI KULTURI

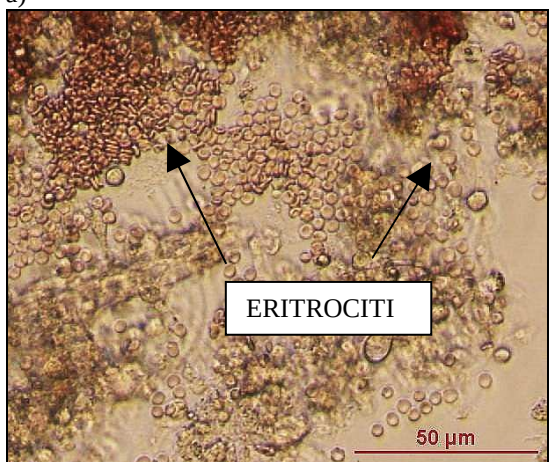
Matične celice smo po izolaciji iz maščobnega tkiva gojili do šeste pasaže. Celice primarne kulture so konfluentno fazo dosegle v 4 oz. 5 dneh, pri nadaljnjih pasažah pa v 3 do 4 dneh. Pred pritrditvijo na dno gojilne posode so celice kazale značilno okroglo obliko, ki se je po pritrditvi in začetku delitev spremenila v podolgovato fibroblastno morfologijo.



a)



b)



c) HI007, P0



č) HI007, P0



d) HI007, P3

Slika 4: Morfologija ASC gojenih v enoslojni kulturi. a) SVF frakcija med procesom izolacije (po centrifugiranju). b) ASC med štejetjem na števni plošči. c) Vzorec HI007 – celice (SVF) po nasaditvi v gojilno posodo. Na fotografiji so vidni predvsem eritrociti, ki smo jih s spiranjem odstranili v roku 24 ur po nasaditvi, ko so se ASC že pritrdile na podlago. č) Vzorec HI007, P0 (primarna kultura) – stanje po nekajkratnem spiranju. Večino eritrocitov in neželenih celic smo uspešno sprali. Celic, ki nam jih ni uspelo odstraniti s spiranjem, pa smo se znebili tekom gojenja. d) Vzorec HI007, P3 (3. pasaža) – ASC med gojenjem v gojišču z 10 % humanim serumom (40 % – 50 % konfluenca).

4.2 IZKORISTEK CELIC GLEDE NA VOLUMEN LIPOASPIRATA

Matične celice smo izolirali iz štirih vzorcev lipoaspirata. V spodnji tabeli so prikazani volumni posameznih vzorcev ter število izoliranih celic v začetni frakciji (SVF – Stromal Vascular Fraction). Izplen se je med posameznimi vzorci zelo razlikoval, od 1×10^6 do 11×10^6 celic. Prikazano je tudi število celic, ki smo jih nasadili – primarna kultura (P0) ter preračunani izkoristki izolacije celic P0/ml lipoaspirata. V stolpcu P1 je podano število celic, ki smo jih dobili v prvi pasaži (P1).

Preglednica 7: Izplen celic glede na volumen lipoaspirata

VZOREC	VOLUMEN LIPOASPIRATA (ml)	ŠTEVILO IZOLIRANIH CELIC (SVF)	P0	P0/ml	P1
HI007	110	$3,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	9090,9	123.000
RM008	110	$11,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	22727,3	654.000
XY009	220	$6,3 \times 10^6$	$0,96 \times 10^6$	4363,6	210.666
KA010	120	$1,8 \times 10^6$	$0,96 \times 10^6$	8000	325.333
			Povprečno št. celic P0/ml		11045,45
			V 100 ml lipoaspirata je torej v povprečju 1.104.545 celic.		

4.3 VPLIV KRIOPREZERVACIJE NA OHRANITEV VIABILNOSTI MATIČNIH CELIC IZ LIPOASPIRATA

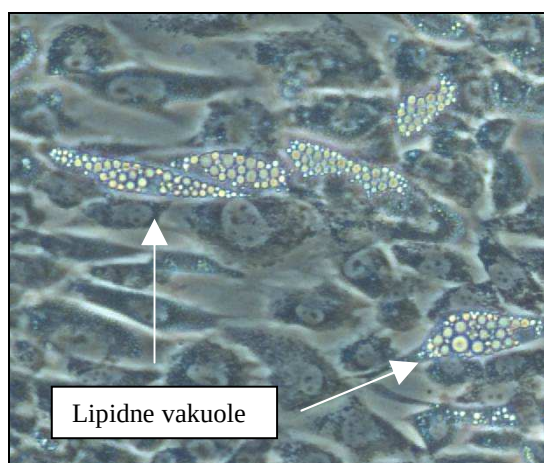
Krioprezervacija lahko povzroči strukturne in funkcionalne poškodbe proteinov ter s tem zmanjša celično viabilnost. V spodnji tabeli je prikazana stopnja preživetja celic v izolirani začetni frakciji celic (SVF). Glede na navedene rezultate, je bilo zamrzovanje/odmrzovanje zelo uspešno. Pri vzorcu KA010 je viabilnost večja od 100 %, kar je posledica napak, do katerih prihaja pri štetju.

Preglednica 8: Ohranitev viabilnosti ASC po enomesečni zamrznitvi.

VZOREC (SVF)	Št. celic pred zamrznitvijo	Št. celic po odmrznitvi	VIABILNOST ASC
HI007	$1,50 \times 10^6$	$1,41 \times 10^6$	94,0 %
RM008	$1,00 \times 10^6$	$0,98 \times 10^6$	98,0 %
XY009	$1,07 \times 10^6$	$1,00 \times 10^6$	93,5 %
KA010	$0,91 \times 10^6$	$1,23 \times 10^6$	135,2 %

4.4 KVALITATIVNO VREDNOTENJE ADIPOGENE IN OSTEOGENE DIFERENCIACIJE PRI NEZAMRZNJENIH MATIČNIH CELICAH IZ LIPOASPIRATA (ASC)

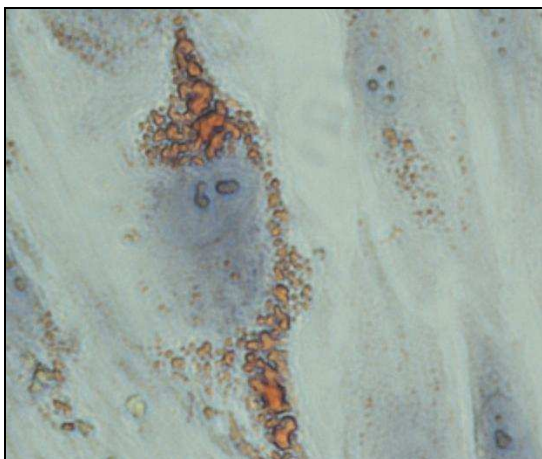
Adipogena diferenciacija – Celice druge (P2) in sedme pasaže (P7) smo gojili v adipoindukcijskem gojišču. Hkrati smo jih gojili tudi v kontrolnem gojišču. Po 10 dneh indukcije smo z barvanjem z Red Oil O dokazovali uspešnost njihove diferenciacije. Med posameznimi vzorci smo pri adipogeni diferenciaciji ASC opazili le razlike v količini in velikosti lipidnih vakuol, sicer pa je bila diferenciacija pri vseh uspešna.



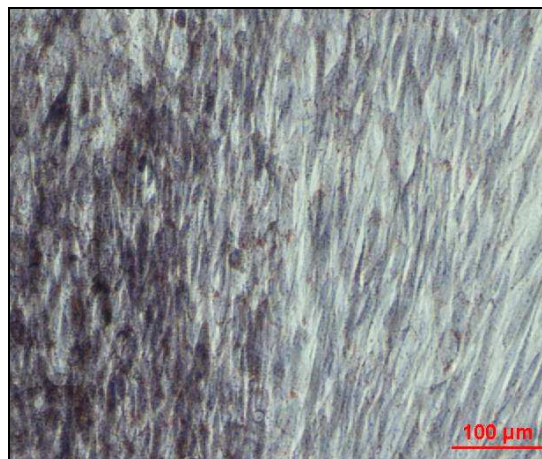
a) KA010, P2, 400x



b) KA010, P2, 400x



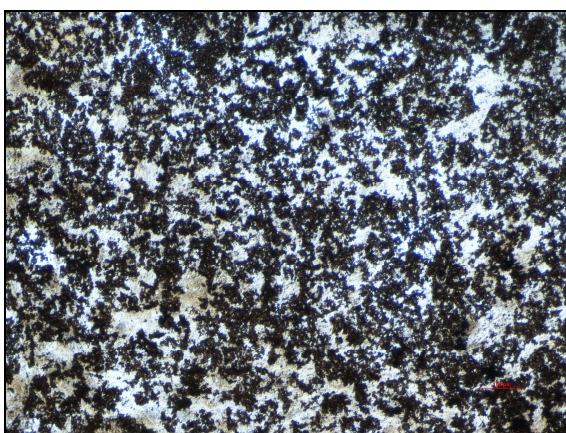
c) KA010, P7, 400x



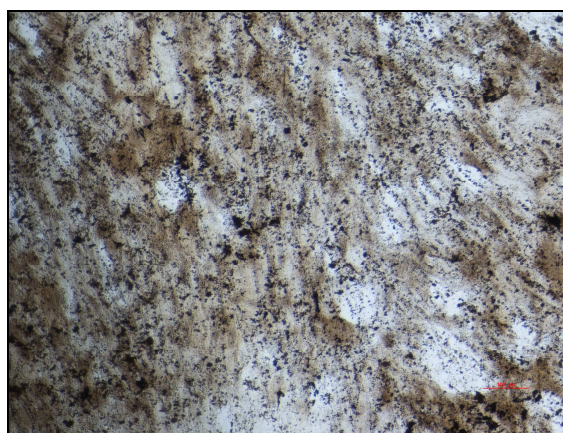
č) KA010, P7, 100x

Slika 5: Fotografije ASC pred in po barvanju z Red Oil O. Primerjava uspešnosti diferenciacije 2. in 7. pasaže pri vzorcu KA010. a) Lipidne vakuole v celicah smo opazili že pred barvanjem. Njihova prisotnost kaže na uspešno adipogeno diferenciacijo. b) in c) Vzorec KA010, P2 in P7 – Uspešna diferenciacija v adipogeno linijo. č) KA010, P7 – Celice v kontrolnem gojišču.

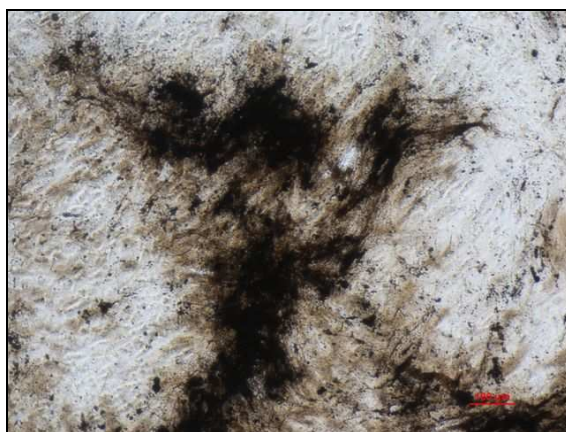
Osteogena diferenciacija – Pri osteogeni diferenciaciji smo celice gojili v osteoindukcijskem mediju od 21 do 26 dni, nato pa smo izvedli barvanje von Kossa.



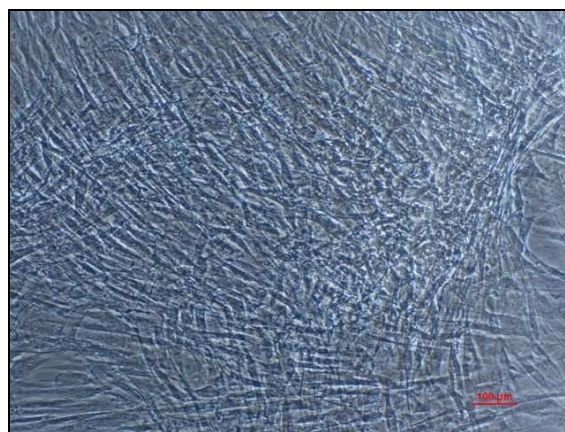
a) HI007, P2, 100x



b) HI007, P2, 100x



c) HI007, P7, 100x



č) HI007, P7, 100x

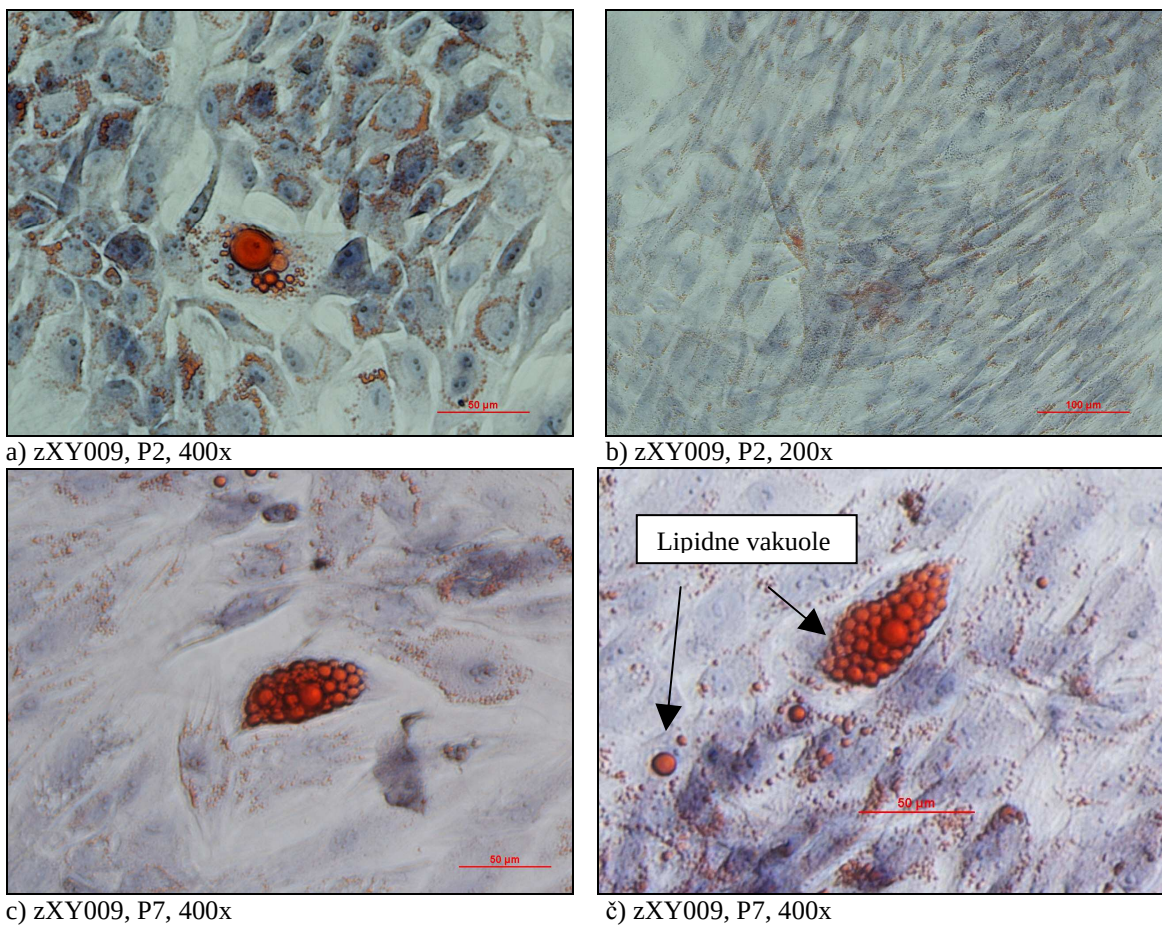
Slika 6: Fotografije ASC po izvedenem barvanju von Kossa. Primerjava uspešnosti osteogene diferenciacije 2. in 7. pasaže pri vzorcu HI007. a) in b) Vzorec HI007, P2 – Črno in rjavo obarvani kalcijevi depoziti so dokaz uspešne osteogene diferenciacije. c) Vzorec HI007, P7 – Kalcijevi depoziti. č) Vzorec HI007, P7 – Celice v kontrolnem gojišču.

Preglednica 9: Primerjava uspešnosti adipogene in osteogene diferenciacije 2. in 7. pasaže nezamrznjenih vzorcev.

NEZAMRZNJENI VZORCI	ADIPOGENA DIFERENCIACIJA		OSTEOGENA DIFERENCIACIJA	
	2. pasaža	7. pasaža	2. pasaža	7. pasaža
HI007	da	da	da – zelo dobro	da – zelo dobro
RM008	da	da	ne	ne
XY009	da	da	ne	ne
KA010	da	da	da	da

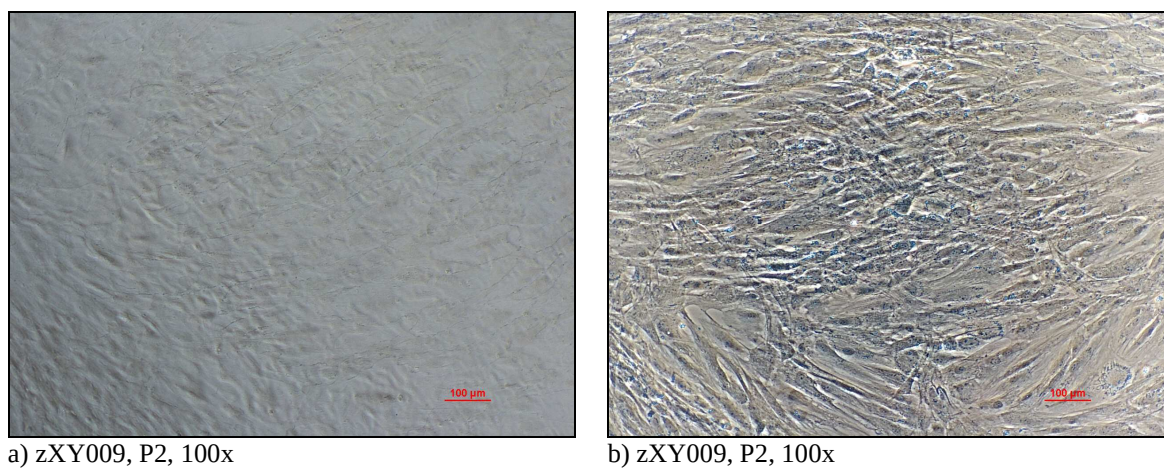
4.5 KVALITATIVNO VREDNOTENJE ADIPOGENE IN OSTEOGENE DIFERENCIACIJE PRI ZAMRZNJENIH MATIČNIH CELICAH IZ LIPOASPIRATA (ASC)

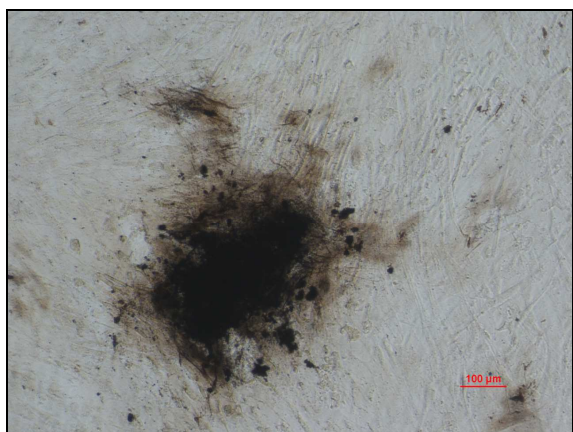
Adipogena diferenciacija – Celice (SVF) smo po enem mesecu odmrznili, jih nasadili ter drugo in sedmo pasažo gojili v adipoindukcijskem gojišču. Paralelno smo jih gojili tudi v kontrolnem gojišču. Po 10 dneh indukcije smo z barvanjem z Red Oil O dokazovali uspešnost njihove diferenciacije.



Slika 7: Fotografije ASC po barvanju z Red Oil O. a) Vzorec zXY009, P2 – V sredini vidimo veliko rdeče obarvano lipidno vakuolo, ki kaže na uspešno adipogeno diferenciacijo. b) Vzorec zXY009, P2 – Gre za kontrolno gojišče, kjer nismo opazili večjih lipidnih vakuol. c) in č) Vzorec zXY009, P7 – Uspešna adipogena diferenciacija.

Osteogena diferenciacija – Po odmrznitvi SVF smo celice 2. in 7. pasaže gojili v osteoindukcijskem mediju od 21 do 26 dni, nato pa smo izvedli barvanje von Kossa.





c) zHI007, P7, 100x

Slika 8: Fotografije ASC po izvedenem barvanju von Kossa. a) Vzorec zXY009, P2 – Odsotnost kalcijevih depozitov kaže na neuspešno osteogeno diferenciacijo. b) Vzorec zXY009, P2 – Celice kontrolnega gojišča. c) Vzorec zHI007, P7 – Veliki črno obarvani kalcijevi depoziti kažejo na zelo uspešno osteogeno diferenciacijo.

Preglednica 10: Primerjava uspešnosti adipogene in osteogene diferenciacije 2. in 7. pasaže zamrznjenih vzorcev.

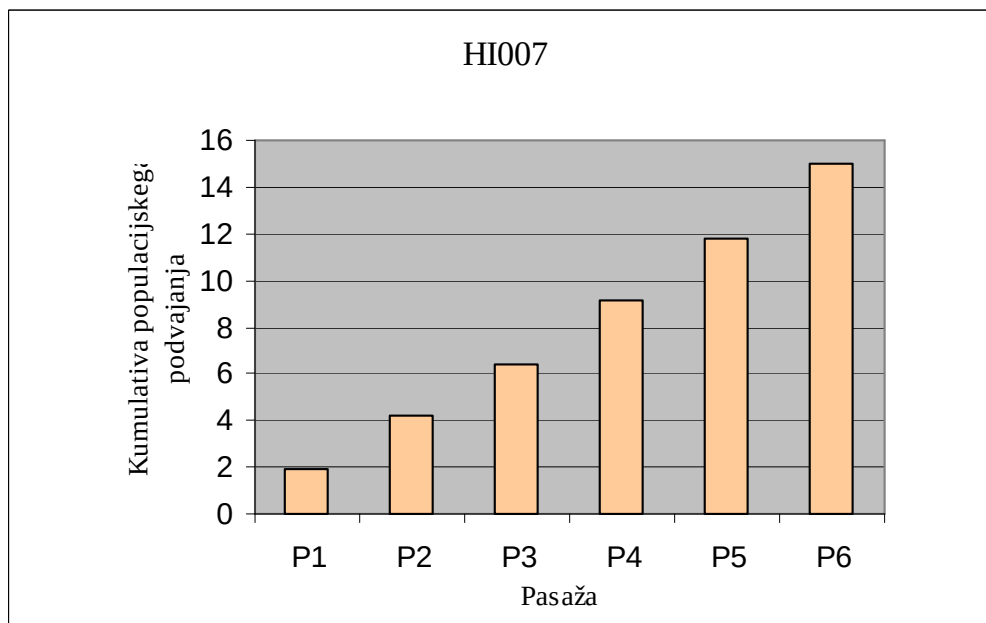
ZAMRZNJENI VZORCI	ADIPOGENA DIFERENCIACIJA		OSTEOGENA DIFERENCIACIJA	
	2. pasaža	7. pasaža	2. pasaža	7. pasaža
zHI007	da	da – slabše	da – dobro	da
zRM008	da	da – slabše	da	ne
zXY009	da	da	ne	da – le v 1 vdolbinici
zKA010	da	da	ne	ne

4.6 PROLIFERACIJSKA IN DIFERENCIACIJSKA SPOSOBNOST NEZAMRZNJENIH MATIČNIH CELIC IZ LIPOASPIRATA (ASC)

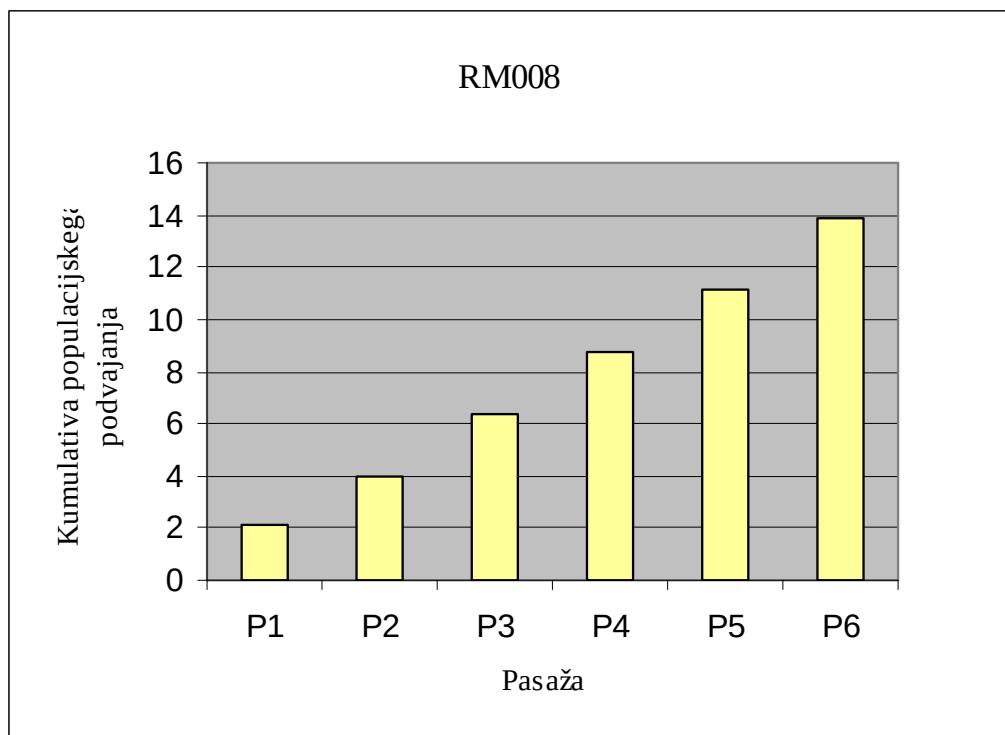
S pomočjo spodnje enačbe smo izračunali populacijsko podvajanje za vsako pasažo posebej.

$$PD = [\log_{10}(N_H) - \log_{10}(N_Z)] / \log_{10}(2) \quad \dots (2)$$

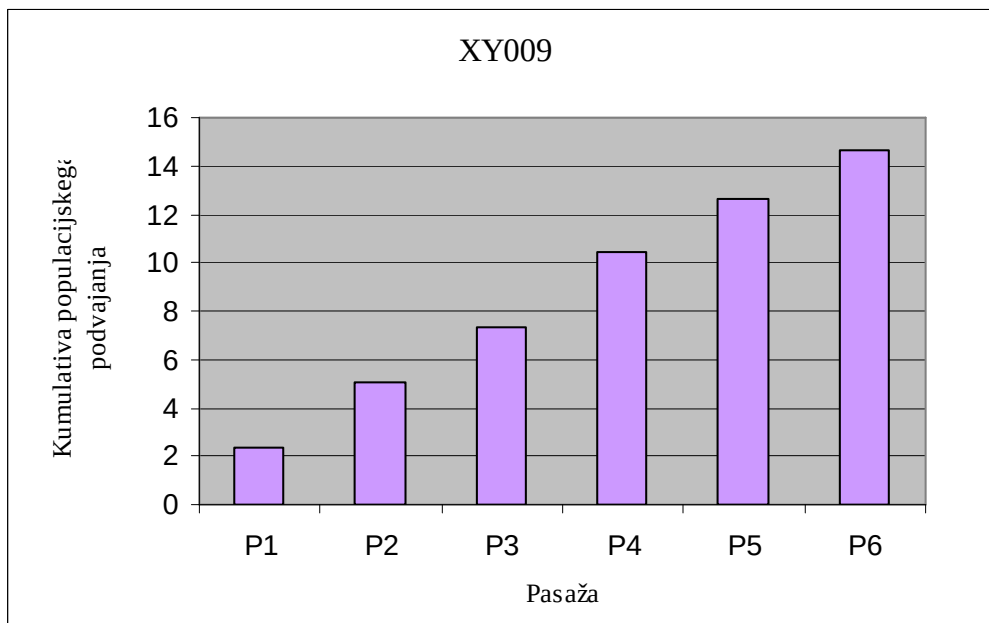
Kumulativne vrednosti smo dobili s seštevanjem vrednosti populacijskega podvajanja posameznih pasaž ter rezultate za posamezen vzorec prikazali v spodnjih grafih.



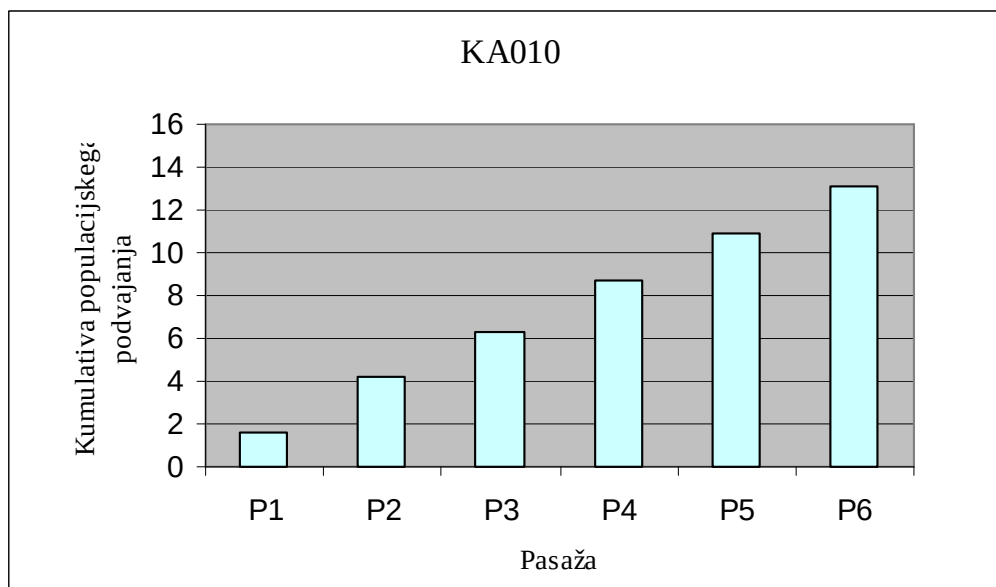
Slika 9: Kumulativna populacijskega podvajanja za vzorec HI007



Slika 10: Kumulativna populacijskega podvajanja za vzorec RM008



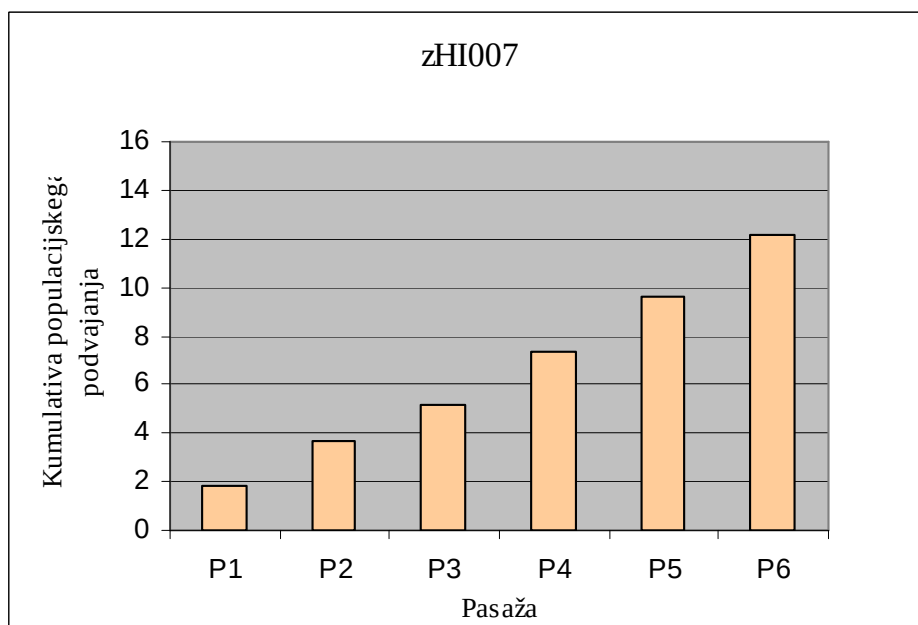
Slika 11: Kumulativa populacijskega podvajanja za vzorec XY009



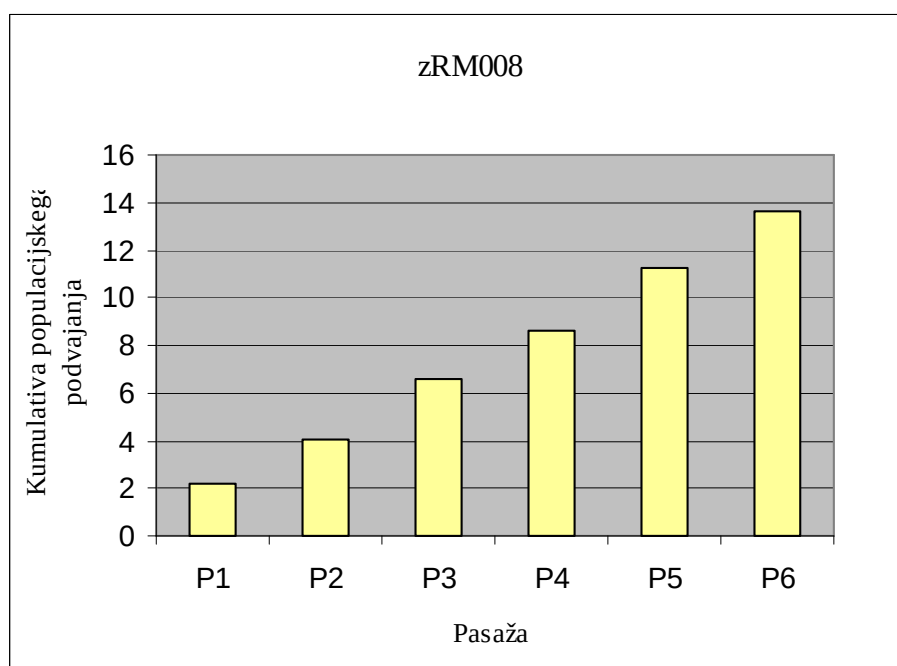
Slika 12: Kumulativa populacijskega podvajanja za vzorec KA010

4.7 PROLIFERACIJSKA IN DIFERENCIACIJSKA SPOSOBNOST ZAMRZNJENIH MATIČNIH CELIC IZ LIPOASPIRATA (ASC)

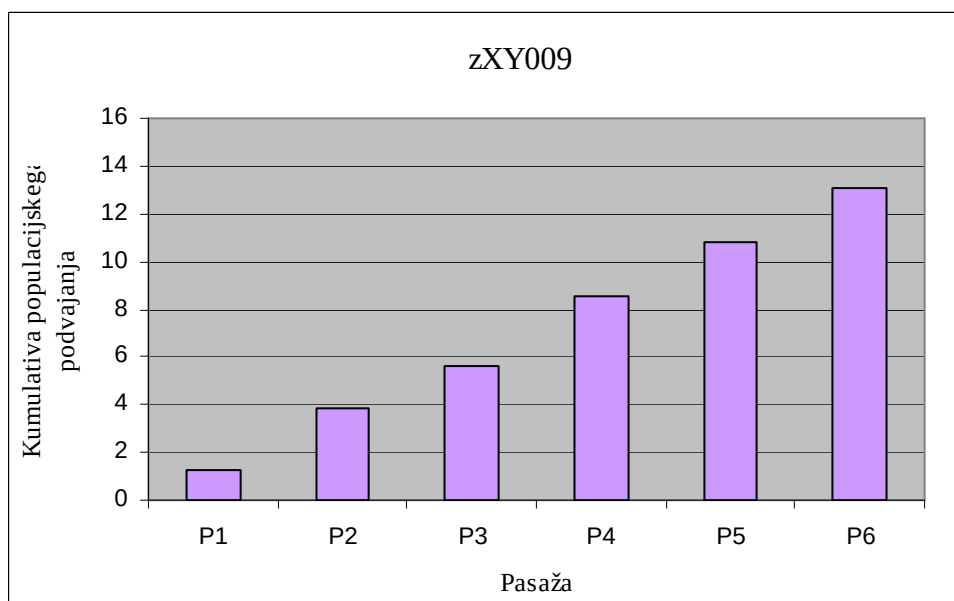
Populacijsko podvajanje ter kumulativne vrednosti smo s pomočjo enačbe izračunali tudi za celice, ki smo jih za en mesec zamrznili. Rezultate smo prikazali v spodnjih grafih.



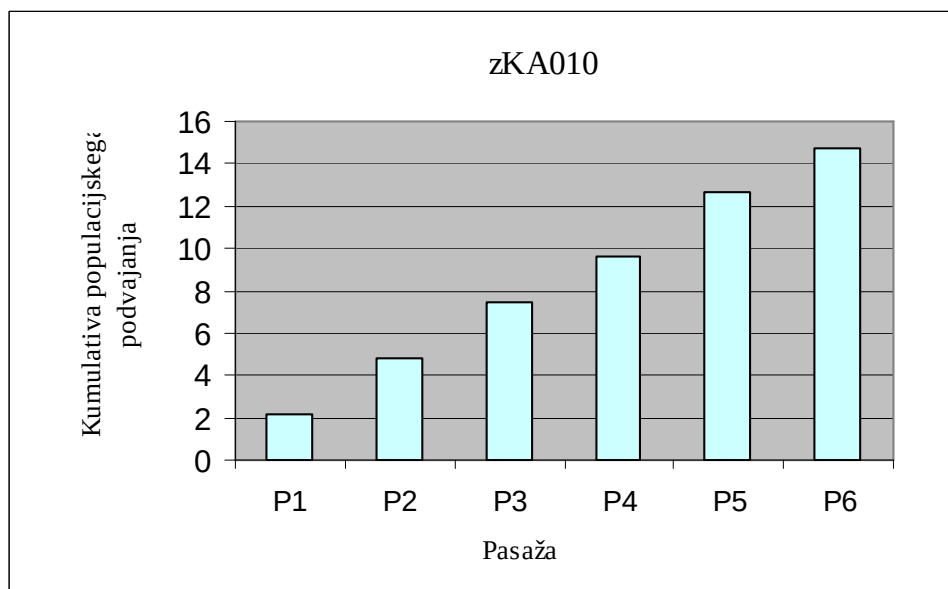
Slika 13: Kumulativa populacijskega podvajanja za zamrznjen vzorec zHI007



Slika 14: Kumulativa populacijskega podvajanja za zamrznjen vzorec zRM008.



Slika 15: Kumulativna populacijskega podvajanja za zamrznjen vzorec zXY009



Slika 16: Kumulativna populacijskega podvajanja za zamrznjen vzorec zKA010

4.8 PRIMERJAVA POPULACIJSKEGA PODVAJANJA (PD) SVEŽIH IN ZAMRZNJENIH VZORCEV

Izvedli smo primerjavo populacijskega podvajanja posameznih pasaž svežih in zamrznjenih vzorcev in z odstotki prikazali razliko med PD zamrznjenih in nezamrznjenih celic. Izračunali smo, kolikšen odstotek PD-ja nezamrznjenih celic predstavlja PD zamrznjenih celic. Glede na rezultate lahko vidimo, da je bila proliferacija zelo uspešna tudi pri zamrznjenih vzorcih in da je v določenih pasažah celo presegla populacijsko podvajanje nezamrznjenih celic.

Preglednica 11: Primerjava PD svežih in zamrznjenih vzorcev HI007 ter odstotek PD zamrznjenih celic glede na nezamrznjene.

Št. pasaže	Populacijsko podvajanje – PD		Odstotek PD zamrznjenih celic v primerjavi z nezamrznjenimi
	HI007	zHI007	
P1	1,93	1,80	93,3 %
P2	2,27	1,87	82,4 %
P3	2,18	1,52	69,7 %
P4	2,77	2,14	77,3 %
P5	2,61	2,29	87,7 %
P6	3,22	2,56	79,5 %

Preglednica 12: PD za svež in zamrznjen vzorec RM008 ter odstotek PD zamrznjenih celic v primerjavi z nezamrznjenimi.

Št. pasaže	Populacijsko podvajanje – PD		Odstotek PD zamrznjenih celic v primerjavi z nezamrznjenimi
	RM008	zRM008	
P1	2,11	2,21	104,8 %
P2	1,84	1,82	98,7 %
P3	2,39	2,57	107,4 %
P4	2,43	1,99	81,8 %
P5	2,39	2,7	112,8 %
P6	2,71	2,38	87,8 %

Preglednica 13: PD za svež in zamrznjen vzorec XY009 ter odstotek PD zamrznjenih celic glede na nezamrznjene.

Št. pasaže	Populacijsko podvajanje – PD		Odstotek PD zamrznjenih celic v primerjavi z nezamrznjenimi
	XY009	zXY009	
P1	2,35	1,22	52,1 %
P2	2,67	2,66	99,8 %
P3	2,28	1,76	77,0 %
P4	3,12	2,89	92,5 %
P5	2,19	2,27	103,8 %
P6	2,06	2,26	109,5 %

Preglednica 14: PD za svež in zamrznjen vzorec KA010 ter odstotek populacijskega podvajanja zamrznjenih celic glede na nezamrznjene.

Št. pasaže	Populacijsko podvajanje - PD		Odstotek PD zamrznjenih celic v primerjavi z nezamrznjenimi
	KA010	zKA010	
P1	1,63	2,14	131,1 %
P2	2,55	2,69	105,7 %
P3	2,13	2,64	123,8 %
P4	2,38	2,16	90,9 %
P5	2,24	3,03	134,9 %
P6	2,15	2,05	95,1 %

V spodnjih dveh preglednicah smo podali povprečne vrednosti kumulativ PD ter izračunali koliko celic v posamezni pasaži dobimo iz ene same celice. Iz dobljenih podatkov je lepo vidno, da je proliferacija pri vzorcih, ki so bili zamrznjeni nekoliko slabša.

Preglednica 15: Povprečne vrednosti kumulativ PD ter izračun števila celic, ki jih tekom pasaž pridobimo iz ene celice.

	KUMULATIVA PD					
Nezamrznjeni vzorci	P1	P2	P3	P4	P5	P6
HI007	1,93	4,2	6,38	9,15	11,76	14,98
RM008	2,11	3,95	6,34	8,77	11,16	13,87
XY009	2,35	5,02	7,3	10,42	12,61	14,67
KA010	1,63	4,18	6,31	8,69	10,93	13,08
povprečje	2,01 ±0,30	4,34±0,47	6,58±0,48	9,26±0,80	11,62±0,75	14,15±0,85
Iz 1 celice dobimo	4,01	20,22	95,84	612,05	3136,63	18179,19

Preglednica 16: Povprečne vrednosti kumulativ PD ter izračun števila celic, ki jih tekom pasaž pridobimo iz ene celice.

	KUMULATIVA PD					
Zamrznjeni vzorci	P1	P2	P3	P4	P5	P6
zHI007	1,8	3,67	5,19	7,33	9,62	12,18
zRM008	2,21	4,03	6,59	8,58	11,28	13,66
zXY009	1,22	3,89	5,64	8,53	10,8	13,06
zKA010	2,14	4,83	7,47	9,63	12,66	14,7
povprečje	1,84±0,45	4,11±0,51	6,22±1,02	8,52±0,94	11,09±1,26	13,40±1,06
Iz 1 celice dobimo	3,59	17,21	74,67	366,46	2179,83	10809,41

Primerjava lastnosti nezamrznjeni in zamrznjenih vzorcev kaže na primernost obeh virov celic za pripravo tkivno inženirskih pripravkov.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Obetajoči rezultati uporabe matičnih celic iz maščobnega tkiva (ASC) v kliničnih študijah kažejo na smiselnost shranjevanja teh celic v biobankah, saj bi to omogočilo potencialno uporabo celičnih pripravkov v prihodnosti. Za shranjevanje so primernejše izolirane celice kot maščobno tkivo, saj so izgube pri zamrzovanju tkiva precej večje. Shranjujemo lahko celice začetne frakcije takoj po izolaciji (SVF) ali pa celice primarne kulture oz. višjih pasaž. Zamrzovanje je v procesu priprave tkivno-inženirskih pripravkov eden bistvenih dejavnikov, zato smo v sklopu diplomske naloge preučevali vpliv krioprezervacije na sposobnost proliferacije in diferenciacije ASC. Usmerili smo se predvsem na adipogeno in osteogeno diferenciacijo ter preverili, kakšen vpliv predstavlja pasažiranje na sposobnost diferenciacije.

Na končno število izoliranih viabilnih celic iz maščobnega tkiva vpliva veliko dejavnikov, med drugim tip posega oz. način pridobivanja maščobnega tkiva ter anatomsko mesto odvzema. Pogosto se omenja tudi vpliv izhodiščne velikosti biopsije ter vpliv postopka izolacije SVF iz tkiva (Gimble in sod., 2009).

V literaturi lahko zasledimo, da izplen ASC med vzorci zaradi že omenjenih dejavnikov močno variira. Količina celic pridobljenih iz lipoaspirata je večja kot pri izrezani maščobi, kar sta poleg Von Heimburgove raziskovalne skupine dokazala tudi Huss in Kratz (von Heimburg in sod., 2004; Huss in Kratz, 2002). Običajno je med odvzemom tkiva in izolacijo celic nek časovni zamik, ki ima prav tako vpliv na izkoristek. Zaradi morebitne nezmožnosti takojšnje izolacije so preverili vpliv 24-urnega shranjevanja na 4 °C. Ugotovili so, da tako shranjevanje negativno vpliva na celice, saj pride v primeru izrezanega maščevja do velikih izgub ASC. Po enodnevnem hranjenju vzorca v hladilniku je preživetje celic v aspiratu liposukcije bistveno boljše kot pri odrezani maščobi (von Heimburg in sod., 2004; Huss in Kratz, 2002).

Von Heimburgovi rezultati kažejo, da je v 1 g sveže pridobljenega maščobnega tkiva od $0,8 \times 10^5$ do $3,5 \times 10^5$ celic. Iz tkiva, ki je bil 24 ur shranjen na 4 °C, je bil izplen malo manjši, in sicer od $0,5 \times 10^5$ do $3,5 \times 10^5$ celic (von Heimburg in sod., 2004). Razlika med izplenom iz lipoaspirata in izrezanega tkiva je po 24-urnem shranjevanju še očitnejša (von Heimburg in sod., 2004; Huss in Kratz, 2002). Zaradi morebitne nezmožnosti takojšnje izolacije celic in hkratne potrebe po shranjevanju je torej bolje, da se tkivo pridobi z liposukcijo.

ASC smo pridobili iz štirih vzorcev lipoaspirata, ki smo jih pred pričetkom obdelave preko noči shranjevali v hladilniku. Po izolaciji smo ugotovili veliko variabilnost v izplenu celic. (Preglednica 7). Vzorcev nismo tehtali, zato težko izvedemo primerjavo z zgoraj navedenimi rezultati. V našem primeru smo izračunali, da se v 1 ml lipoaspirata v povprečju nahaja $0,11 \times 10^5$ celic. Iz 100 ml lipoaspirata torej v povprečju dobimo $1,1 \times 10^6$ celic. Najmanj ASC smo izolirali iz vzorca KA010, in sicer le $1,8 \times 10^6$ celic. Izjemno veliko celic pa je vseboval vzorec RM008, iz katerega smo jih pridobili kar $11,0 \times 10^6$. Kot

že rečeno je vzrokov za precejšnje razlike med vzorci več, in sicer biološka variabilnost, spol in starost donorja, tip in lokacija maščobnega tkiva ter način odvzema tkiva.

Takojšnja obdelava lipoaspirata in izolacija ASC iz sveže pridobljenega maščobnega tkiva ni vedno mogoča, zato se pojavlja potreba po izpopolnitvi metode shranjevanja tkiva ter zamrzovanja že izoliranih celic (Goh in sod., 2007). Krioprezervacija, ki zaradi izjemno nizkih temperatur in zaustavitve biokemijskih procesov povzroči stabilizacijo celic in tako omogoča dolgotrajno shranjevanje, je v takem primeru torej eden ključnih korakov (Simione, 1998). Cilj večine raziskovalnih skupin je ohraniti čim večjo viabilnost in multipotentnost ASC kljub dolgotrajni krioprezervaciji. Goh je s sodelavci dokazal, da na ohranitev viabilnosti močno vpliva gostota oz. koncentracija ASC v zamrzovalnem mediju. Najboljšo viabilnost (81,10 %) so dosegli pri koncentraciji $0,5 \times 10^6$ celic/ml zamrzovalnega medija. Omenjeni vir sestave uporabljenega medija žal ne navaja. Po enomesečni zamrznitvi v tekočem dušiku so se celice brez težav pritrdile na podlago gojilne posode, razvile fibroblastno morfologijo ter začele lepo rasti (Goh in sod., 2007). Namen raziskave, ki jo je s sodelavci opravil Gonda, je bil preveriti vpliv krioprezervacije na fenotip, proliferacijo in diferenciacijski potencial ASC. To so namreč lastnosti, ki imajo v celičnih terapijah velik pomen (Gonda in sod., 2008). Ker pred začetkom te raziskave niso imeli popolnoma optimiziranega protokola zamrzovanja, so uporabili medij, ki je na Japonskem zaradi dobrih rezultatov najpogostejše v uporabi, Cell Banker 1 (Wako Chemicals Co., Osaka, Japonska). V primerjavi z DMSO, trehalozo, dekstranom, metilcelulozo in njihovimi kombinacijami je ta zamrzovalni medij pokazal precej boljše rezultate. Točne sestave sicer ne navajajo, znano je le, da vsebuje goveji serum (angl., Fetal Bovine Serum – FBS). Primerljivi podvajalni časi pred in po zamrznitvi pa kažejo, da 6-mesečna krioprezervacija na proliferacijo celic ni imela posebnega vpliva (Gonda in sod., 2008).

Tudi v naši raziskavi smo se osredotočili na vpliv zamrzovanja na preživetje celic ter sposobnost razmnoževanja in diferenciacije. Po izolaciji smo $\frac{1}{2}$ celic SVF takoj zamrznili, $\frac{1}{2}$ pa smo gojili do šeste pasaže (P6). S predhodnimi testi je bila izvedena optimizacija protokola zamrzovanja, kjer se je najboljše izkazal medij z 10 % DMSO in 90 % humanega seruma. Zamrzovali smo po $0,5 - 1,0 \times 10^6$ celic/ml zamrzovalnega medija. Po enem mesecu smo celice odmrznili, jih prešteli ter nato gojenje in diferenciacijo izvedli na enak način kot pri nezamrznjenih. Dobljeni rezultati kažejo, da je bilo zamrzovanje/odmrzovanje zelo uspešno, saj je bila viabilnost pri vseh 4 vzorcih nad 90 %, kar je za 10 % več kot navajajo Goh in sodelavci (Preglednica 8). Pri vzorcu KA010 je bilo preživetje celo večje od 100 %, kar pa je posledica napak, do katerih prihaja pri štetju. Uporabljen protokol zamrzovanja je torej zelo primeren za uporabo, saj pri ASC zagotavlja ohranitev visoke stopnje viabilnosti.

Po poročanju nekaterih raziskovalcev se ASC tekom vsake pasaže podvojijo od 2 do 4-krat (Wall in sod., 2007). V članku tudi navajajo, da stopnja rasti tekom pasažiranja sicer upada, pri čemer pride do podaljšanja podvajalnega časa, a se v 10 pasažah ASC lahko vseeno podvojijo kar 34-krat (Wall in sod., 2007).

Proliferacijske sposobnosti naših celic niso bile tako visoke, kot navaja Wall. V posamezni pasaži so se navadno podvojile 2-krat, le izjemoma 3-krat. Upoštevati moramo, da poleg že

našteti dejavniki, ki vplivajo na izplen, na sposobnost proliferacije in diferenciacije ASC, vplivajo še pogoji gojenja, gostota nasaditve celic, rastni medij ter število pasaž (Schäffler in Büchler, 2007) kar doprinese k omenjeni razliki med Wallsovimi in našimi ASC. Primerjava vrednosti PD svežih in zamrznjenih vzorcev kaže, da so celice s stališča proliferacije tudi po enomesečni zamrznitvi primerne za gojenje. Izračuni populacijskega podvajanja namreč kažejo, da so vrednosti pri zamrznjenih celicah v večini primerov le malo nižje kot pri nezamrznjenih. Med vzorci izstopa KA010, saj je bila proliferacija po zamrznitvi celo boljša in so vrednosti PD tudi za več kot 30 % večje (Preglednica 13). Podobne, a malo slabše rezultate smo dobili tudi pri vzorcu RM008. Zavedati se moramo, da na samo proliferacijo bistveno vplivajo pogoji gojenja ter sestava gojilnega medija. Razlike v sestavi serumov so namreč velike, zato lahko to odločilno vpliva na celično rast. Najbolje bi bilo, da bi celice vseh vzorcev gojili v istem serumu oz. da bi pripravili pool serumov in s tem zmanjšali vpliv gojilnega medija. Upoštevati moramo, da so lahko tudi napake, do katerih prihaja pri štetju, eden od možnih razlogov za napačno predstvo o povečani sposobnosti proliferacije omenjenih vzorcev. Kljub vsemu pa izračun in primerjava povprečnih vrednosti PD kažeta, da pri svežih vzorcih iz ene celice v šestih pasažah v povprečju dobimo približno 7.000 celic več kot pri zamrznjenih ASC, kar predstavlja zanemarljivo razliko (Preglednica 14, Preglednica 15). Na osnovi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da gojenje do šeste pasaže (P6) ne vpliva bistveno na padec proliferacijskih sposobnosti ASC.

Eksperimentalni podatki iz študij *in vitro* ter *in vivo* kažejo na multipotentnost matičnih celic izoliranih iz maščobnega tkiva. Pod vplivom različnih kemijskih dejavnikov in rastnih faktorjev je v *in vitro* pogojih relativno enostavna diferenciacija v mezodermalne celične linije kot so adipociti, hondrociti, skeletni miociti in osteoblasti (Zuk in sod., 2001). V diplomski nalogi smo se osredotočili le na osteogeni in adipogeni diferencijski potencial ASC, pri čemer nas je zanimal predvsem vpliv zamrzovanja na ohranitev omenjenih potencialov v drugi in sedmi pasaži. Tudi Goh in sodelavci so primerjali potencial diferenciacije pred in po zamrzovanju. V adipogeni diferenciaciji niso opazili razlik, pri diferenciaciji v osteogeno linijo pa so po zamrznitvi zabeležili rahel upad. Dokazali so torej, da se diferencijski potencial ASC kljub enomesečnem zamrzovanju ohrani ter s tem potrdili, da je vpliv zamrzovanja na ASC zanemarljiv (Goh in sod., 2007). Tudi pri naših pogojih gojenja in diferenciacije smo po 10 dneh adipoindukcije z barvanjem z lipofilnim barvilom Red Oil O dokazali zelo uspešno adipogeno diferenciacijo pri vseh vzorcih (Slika 5, Slika 7), vendar pa so bile lipidne vakuole v celicah svežih vzorcev malenkost večje in številčnejše kot pri zamrznjenih. Ker je pasažiranje eden pomembnejših dejavnikov, so se nekatere znanstvene skupine ukvarjale s preučevanjem vpliva le-tega. Po podatkih Dickerja in sodelavcev naj bi se adipogeni diferencijski potencial ASC med gojenjem ohranjal in naj se tekom pasažiranja ne bi spreminjal (Dicker in sod., 2005). Naši rezultati pa kažejo na nekoliko slabšo adipogeno diferenciacijo v kasnejši pasaži. Primerjava rezultatov 2. in 7. pasaže je pokazala bolj izrazito adipogeno diferenciacijo v zgodnji pasaži. Glede na to, da so ASC matične celice iz maščevja, lahko sklepamo, da so bolj nagnjene k razvoju v smeri maščobnih celic, s čimer lahko razlagamo uspešnost adipogene indukcije.

Pri razvoju ASC v smeri kostnih celic pa smo imeli več problemov, saj je bila uspešnost le 50 % (Slika 6, Slika 8). Po 21 do 26-dnevnem gojenju v osteoindukcijskem mediju smo

celice pobarvali. Največji osteogeni potencial je pokazal vzorec HI007, kjer so se tako v 2. kot v 7. pasaži tvorili veliki kalcijevi depoziti. Tvorba slednjih je bila uspešna tudi po odmrznitvi. Pri vzorcu KA010 smo jih opazili in dokazali le pred zamrznitvijo, potem pa ne več. Pri svežih vzorcih RM008 in XY009 do tvorbe omenjenih kristalov sploh ni prišlo. Po odmrznitvi pa je bila pri obeh uspešnost le 50 %. Pri zRM008 so se kalcijevi depoziti tvorili le v 2. pasaži, pri zXY009 pa le v 7. pasaži, a le v eni od dveh luknjic. Tudi Goh in sodelavci so po zamrznitvi zaznali rahel upad v sposobnosti osteogene diferenciacije (Goh in sod., 2007).

Preseneča dejstvo, da je pri istem biološkem vzorcu enkrat prišlo do osteogene diferenciacije, drugič pa ne. Ob tem se je postavljalo vprašanje, kaj je vzrok za ta pojav. Po poročanju nekaterih člankov (Rada in sod., 2009) je znotraj izolirane frakcije SVF več različnih progenitorjev, kar bi bil lahko razlog za omenjen fenomen. Verjetno je stopnja diferenciacije odvisna od števila progenitorskih celic, ki jih zajamemo v vzorček namenjen indukciji. Sklepamo, da je torej največji problem vzorčenje, saj smo za indukcijo ene luknjice iz celične suspenzije odvzeli razmeroma malo celic. Predpostavljamo, da bi bila v primeru večjega števila ASC izpostavljenih osteoindukciji, uspešnost večja. Iz pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, da se tudi zamrznjeni vzorci enako uspešno diferencirajo v osteogeno linijo.

Naš namen je bil določiti tudi minimalno količino maščobnega tkiva, ki bi zadostovala za pripravo nekega tkivno-inženirskega pripravka. Zavedati se je potrebno, da je za uporabo v celičnih terapijah zaželena uporaba celic čim nižjih pasaž. Daljše gojenje v *in vitro* pogojih ima namreč po poročanju nekaterih študij na celice negativen vpliv, saj povzroča številne spremembe. Pride do zmanjšanja proliferacijskih in diferenciacijskih sposobnosti, velikost celic pa se poveča. Poleg večje kromosomske nestabilnosti, so dokazali še spremembe v celični ekspresiji. Pred transplantacijo je zato potrebna kontrola kakovosti celičnih pripravkov, saj morajo biti celice v čim boljšem stanju. Zavedati se moramo, da se replikativni senescenci kljub standardiziranim pogojem gojenja ne moremo izogniti. Molekularna analiza določene skupine genov tako predstavlja orodje za ugotavljanje učinkovitosti in varnosti dolgotrajnega gojenja MC ter primernost njihove uporabe v terapevtske namene (Wagner in sod., 2010).

Izračunali smo, da iz 100 ml lipoaspirata po tretji pasaži (P3) iz odmrznjenih celic pridobimo $82,5 \times 10^6$ celic in po četrti (P4) $404,8 \times 10^6$ celic, kar bi zadostovalo za večino potencialnih tkivno-inženirskih aplikacij. Za spodnjo mejo odvzetega tkiva smo torej določili 100 ml lipoaspirata, kar je zelo majhen volumen glede na celotno količino odstranjenega tkiva pri liposukciji.

Ne le da je viabilnost celic v lipoaspiratu boljša kot v odrezanem tkivu, lipoaspirat je tudi bolj kontaminiran je z drugimi tipi celic (endotelijske celice, fibroblasti, ...), kar predstavlja s stališča priprave ožiljenega tkivno-inženirskega pripravka dodatno prednost (Planat-Benard in sod., 2004; Scherberich in sod., 2007).

Naši rezultati kažejo, da krioprezervacija ne ogroža celične viabilnosti, saj je bila ta tudi po enomesečnem zamrzovanju zelo visoka, prav tako proliferacija. V celicah so se lipidne vakuole oz. kalcijevi depoziti tvorili tako pred kot po zamrzovanju, kar kaže na dobro

ohranjeno sposobnost diferenciacije. Enomesečno zamrzovanje ASC v tekočem dušiku je torej sprejemljivo in s stališča celičnih terapij ne predstavlja tveganja.

5.2 SKLEPI

- Izplen ASC iz štirih vzorcev lipoaspirata je bil zelo različen in je zaradi vpliva različnih dejavnikov močno variiral.
- Pri preverjanju vpliva pasažiranja na ohranitev proliferacijskih sposobnosti se je pokazalo, da gojenje do šeste pasaže (P6) nima posebnega vpliva. Prav tako gojenje bistveno ne zmanjša diferenciacijskih sposobnosti ASC.
- Z uporabljenim protokolom zamrzovanja smo dosegli ohranitev visoke stopnje viabilnosti ASC, kar kaže na njegovo učinkovitost in uporabnost.
- Ugotovili smo, da zamrzovanje ne vpliva bistveno na sposobnost proliferacije. Zaznali smo sicer minimalne razlike v vrednostih populacijskega podvajanja, a je gojenje ASC kljub temu tudi po zamrzovanju potekalo brez težav in posebnosti.
- Prav tako zamrzovanje ni imelo posebnega vpliva na adipogeno in osteogeno diferenciacijo. Vzorci so se tudi po enomesečnem zamrzovanju enako uspešno diferencirali v obe liniji, kar smo kvalitativno ovrednotili z biokemijskimi metodami barvanja.
- Kot minimalno količino potrebnega tkiva, ki bi zadostovala za pripravo nekega tkivno-inženirskega pripravka, smo določili 100 ml lipoaspirata.

6 POVZETEK

Matične celice (MC) se zaradi sposobnosti samoobnavljanja in diferenciacije v specializirane celične tipe vse pogostejše omenja v povezavi s tkivno-inženirskimi aplikacijami. Zaradi navedenih lastnosti so namreč primerne za zdravljenje različnih poškodb in bolezni. Med iskanjem alternativnih virov omenjenih celic so znanstveniki odkrili, da je človeško podkožno tkivo dostopen vir velikega števila odraslih matičnih celic ASC (angl. Adipose-derived Stem Cells). Glede na trenutne trende in naraščanje števila ljudi s prekomerno telesno težo ima podkožno maščevje v primerjavi s kostnim mozgom kar nekaj prednosti, saj je bogatejši in dostopnejši vir MC. Za izolacijo bi tako lahko uporabili lipoaspirat, ki v liposukcijskih posegih predstavlja odpadno tkivo. Lahka dostopnost, številčnost, velik diferenciacijski potencial ASC in obetajoči rezultati kliničnih študij, kažejo na smiselnost shranjevanja teh celic v biobankah za potencialno uporabo v prihodnosti. Zamrzovanju je zato potrebno posvetiti veliko pozornosti, saj je eden bistvenih korakov v celotnem procesu. V diplomski nalogi smo preučevali vpliv zamrzovanja na sposobnost proliferacije in diferenciacije ASC. Osredotočili smo se na adipogeno in osteogeno diferenciacijo ter preverili, kako na diferenciacijo vpliva pasažiranje.

Stromalno vaskularno frakcijo (SVF) smo izolirali iz štirih vzorcev lipoaspirata. Po encimski razgradnji s kolagenazo tipa I in štetju smo ugotovili veliko variabilnost v izplenu ASC. Izračunali smo, da iz 100 ml lipoaspirata v povprečju dobimo $1,1 \times 10^6$ celic. Nasadili smo le polovico SVF, drug del frakcije pa smo za 1 mesec zamrznili v tekočem dušiku. Celice smo gojili v D-MEM/F12 ob dodatku 10 % humanega seruma. Indukciji smo izvedli na celicah druge in sedme pasaže ter uspešnost diferenciacije vrednotili z biokemijskim barvanjem. Po 10 dneh adipoindukcije smo diferenciacijo v adipogeno linijo dokazovali z barvanjem Red Oil O. Osteogeno diferenciacijo pa smo dokazovali med 21. in 26. dnem z barvanjem von Kossa. Da bi ugotovili vpliv krioprezervacije na ASC smo drugo polovico SVF po enem mesecu odmrznili in celoten postopek gojenja, indukcije in barvanja ponovili. Sledila je primerjava rezultatov med svežimi in zamrznjenimi vzorci.

Po enomesečnem zamrzovanju smo pri preverjanju živosti ugotovili zelo visoko viabilnost celic. Pri vseh štirih vzorcih je bila le-ta nad 90 %, kar kaže na zelo dobro optimiziran postopek zamrzovanja. Primerjava vrednosti populacijskega podvajanja (PD) ni pokazala bistvenega upada proliferacije po zamrznitvi. Kljub temu, da so vrednosti v povprečju sicer malenkost nižje kot pred zamrzovanjem, je gojenje potekalo normalno in brez posebnosti. Z barvanjem smo tudi po zamrzovanju dokazali uspešno diferenciacijo v obe liniji, kar kaže na to, da krioprezervacija prav tako ne vpliva bistveno na adipogeno in osteogeno diferenciacijo. Vsi vzorci so pokazali velik adipogen potencial. Osteogena diferenciacija pa je bila uspešna le v polovici primerov. Presenetilo nas je dejstvo, da je v primerih istega biološkega vzorca enkrat prišlo do diferenciacije v osteogeno linijo, drugič pa ne. Vzrok za ta pojav je verjetno v tem, da je stopnja diferenciacije odvisna od števila progenitorskih celic, ki jih izpostavimo indukcijskem mediju. Sklepamo, da je torej največji problem vzorčenje, saj smo za indukcijo ene luknjice 24-wella iz celične suspenzije odvzeli razmeroma malo celic.

Na osnovi dobljenih rezultatov lahko povzamemo, da so celice tudi po zamrzovanju primerne za uporabo v terapevtske namene, saj ohranijo visoko stopnjo viabilnosti in proliferacije, ohrani pa se tudi diferenciacijski potencial, kar je bistvenega pomena za tkivno-inženirske aplikacije.

7 VIRI

- Avram A.S., Avram M.M., James W.D. 2005. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53, 4: 671-683
- Bajuk-Studen K., Preželj J., Kocjan T., Pfeifer M. 2009. Mehanizmi srčno-žilne ogroženosti žensk s sindromom policističnih ovarijev. *Zdravstveni vestnik*, 78: 129-135
- Barlič A., Božikov K. 2010. Matične celice iz maščobe in njihova uporaba. *Farmacevtski vestnik*, 61: 42-45
- Cristofalo V.J., Allen R.G., Pignolo R.J. 1998. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95: 10614-10619
- Choumerianou D.M., Dimitriou H., Kalmanti M. 2008. Stem cells: promises versus limitations. *Tissue Engineering*, 14: 53-60
- Coleman S.R., Saboeiro A.P. 2007. Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 119: 775-785
- Cone R.D. 1999. The central melanocortin system and energy homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 10, 6: 211-216
- Cornelius P., MacDougald O.A., Lane M.D. 1994. Regulation of adipocyte development. *Annual Review of Nutrition*, 14: 99-129
- Deslex S., Negrel R., Vannier C., Etienne J., Ailhaud G. 1987. Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *International Journal of Obesity*, 11: 19-27
- Dicker A., Le Blanc K., Astrom G. 2005. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Experimental Cell Research*, 308: 283-290
- Faust I.M., Johnson P.R., Hirsch J. 1977. Adipose tissue regeneration following lipectomy. *Science*, 197, 4301: 391-393
- Friedman J.M., Halaas J.L. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395: 763-770
- Fukuhara A., Matsuda M., Nishizawa M., Segawa K., Tanaka M., Kishimoto K. 2005. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, 307: 426-430

- Garcia-Olmo D., Herreros D., Pascual I., Pascual J.A., Del-Valle E., Zorrilla J., De-La-Quintana P., Garcia-Arranz M., Pascual M. 2009. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Diseases of the Colon & Rectum*, 52, 1: 79-86
- Gimble J.M., Katz A.J., Bunnell A.B. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 100: 1249-1260
- Goh B.C., Thirumala S., Kilroy G., Devireddy R.V., Gimble J.M. 2007. Cryopreservation characteristics of adipose-derived stem cells: maintenance of differentiation potential and viability. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1, 4: 322-324
- Gonda K., Shigeura T., Sato T., Matsumoto D., Suga H., Inoue K., Aoi N., Kato H., Sato K., Murase S., Koshima I., Yoshimura K. 2008. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 121: 401-410
- Hanke C.W., Coleman W.P. III. 1999. Morbidity and mortality related to liposuction. Questions and answers. *Dermatologic Clinics*, 17: 899-902
- von Heimburg D., Hemmrich K., Haydarlioglu S., Staiger H., Pallua N. 2004. Comparison of viable cell yield from excised versus aspirated adipose tissue. *Cells Tissues Organs*, 178, 2: 87-92
- Huss F.R., Kratz G. 2002. Adipose tissue processed for lipoinjection shows increased cellular survival in vitro when tissue engineering principles are applied. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*, 36, 3: 166-171
- Kaplan F.S., Hahn G.V., Zasloff M.A. 1994. Heterotopic ossification: two rare forms and what they can teach us. *Journal of American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2: 288-296
- Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H., Bieback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. *Stem Cells*, 24, 6: 1294-1301
- Jodicke A., Christophis P. 2004. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 32: 370-373
- Locke M., Windsort J., Dunbar P.R. 2009. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 79: 235-244

- McIntosh K., Zvonic S., Garrett S., Mitchell J.B., Floyd Z.E., Hammill L., Kloster A., Halvorsen Y.D., Ting J.P., Storms R.W., Goh B., Kilroy G., Wu X., Gimble J.M. 2006. The immunogenicity of human adipose derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*, 24: 1245-1253
- Mesimäki K., Lindroos B., Törnwall J., Mauno J., Lindqvist C., Kontio R., Miettinen S., Suuronen R. 2009. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 38: 201-209
- Mohamed-ali V., Pinkney J.H., Coppack S.W. 1998. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *International Journal of Obesity Related Metabolism Disorder*, 22: 1145-1158
- Nonogaki K., Fuller G.M., Fuentes N.L., Moser A.H., Staprans I., Grunfeld C. 1995. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology*, 136: 2143-2149
- Peroni D., Scambi I., Pasini A., Lisi V., Bifari F., Krampera M., Rigotti G., Sbarbati A., Galie M. 2008. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. *Experimental Cell Research* 314, 3: 603-615
- Planat-Benard V., Silvestre J.S., Cousin B., André M., Nibbelink M., Tamarat R. 2004. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, 109: 656-663
- Prunet-Marcassus B., Cousin B., Caton D., Andre M., Penicaud L., Casteilla L. 2006. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Experimental Cell Research*, 312, 6: 727-736
- Puissant B., Barreau C., Bourin P., Clavel C., Corre J., Bousquet C., Taureau C., Cousin B., Abbal M., Laharrague P., Penicaud L., Casteilla L., Blancher A. 2005. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British Journal of Haematology*, 129, 1: 118-129
- Rada T., Reis R. L., Gomes M. E. 2009. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering*, 15: 113-125
- Rodbell M., Jones A.B. 1966. Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase c (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *The Journal of Biological Chemistry*, 241: 140-142

- Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. II. 1966. The similar effects of phospholipase c (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 241: 130-139
- Rondinone C.M. 2006. Adipocyte-derived hormones, cytokines and mediators. *Endocrine*, 29, 1: 81-90
- Rožman P., Jež M. 2009. Matična celica in napredno zdravljenje (napredno zdravljenje s celicami, genska terapija in tkivno inženirstvo) – Slovar. Ljubljana, DCTIS – Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije.
http://www.dctis.org/drustvo/o_nas.php (20.05.2010)
- Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M.C., de la Fuente R., Cigudosa J.C., Lloyd A.C., Bernad A. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Research*, 65: 3035-3039
- Rubio D., Garcia S., Paz M.F., De la Cueva T., Lopez-Fernandez L.A., Lloyd A.C., Garcia-Castro J., Bernad A. 2008. Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS ONE*, 1: e1398.
- Schäffler A., Büchler C. 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells – basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*, 25, 4: 818-827
- Scherberich A., Galli R., Jaquiere C., Farhadi J., Martin I. 2007. Three-dimensional perfusion culture of human adipose tissue-derived endothelial and osteoblastic progenitors generates osteogenic constructs with intrinsic vascularization capacity. *Stem Cells*, 25: 1823-1829
- Shiffman M.A., Mirrafati S. 2001. Fat transfer techniques: the effect of harvest and transfer methods on adipocyte viability and review of the literature. *Dermatologic Surgery*, 27: 819-826
- Simione P.F. 1998. Cryopreservation manual. M.S. of the American type culture collection (ATCC) in cooperation with Nalge Nunc International Corp.
<http://www.nalgenelabware.com/techdata/Technical/cryo.pdf> (maj, 2010)
- Sommer B., Sattler G. 2000. Current concepts of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. *Dermatologic Surgery*, 26: 1159-1166
- Stosich M.S., Mao J.J. 2007. Adipose tissue engineering from human adult stem cells: clinical implications in plastic and reconstructive surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 119, 1: 71-83

- Tchkonina T., Giorgadze N., Pirtskhalava T., Thomou T., DePonte M., Koo A., Forse R.A., Chinnappan D., Martin-Ruiz C., von Zglinicki T., Kirkland J.L. 2006. Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes*, 55, 9: 2571-2578
- Urtizberea J.A., Testart H., Cartault F., Boccon-Gibod L., Le Merrer M., Kaplan F.S. 1998. Progressive osseous heteroplasia. *The Journal of Bone and Joint Surgery [Br]*, 80-B: 768-771
- Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 12: 4279-4295
- Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7: 211-228
- Wagner W., Bork S., Lepperdinger G., Joussen S., Ma N., Strunk D., Koch C. 2010. How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? *Aging*, 2, 4: 224-230
- Wall M., Bernacki S., Lobo E. 2007. Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering*, 13, 6: 1291-1298
- Yoshimura K., Sato K., Aoi N., Kurita M., Hirohi T., Harii K. 2008. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plastic Surgery*, 32: 48-55
- Young C., Jarrell B.E., Hoying J.B., Williams S.K. 1992. A porcine model for adipose tissue-derived endothelial cell transplantation. *Cell Transplant*, 1: 293-298

ZAHVALA

Mentorju, doc. dr. Miomirju Kneževiću se iskreno zahvaljujem, da me je tekom študija navdušil za področje medicinske biotehnologije in mi s tem odprl vrata v svet, ki sem si ga vedno želela spoznati.

Posebno zahvalo namenjam somentorici in delovni mentorici, dr. Ariani Barlič za posredovanje dragocenega znanja in izkušenj, za vse nasvete, spodbudo, pomoč pri pisanju ter za strokovni pregled diplomske naloge.

Najlepše se zahvaljujem podjetju Educell, ki mi je omogočilo izvedbo eksperimentalnega dela naloge, ter vsem zaposlenim za prijetno in spodbudno delovno okolje. Danici Gantar pa izrekam zahvalo za nesebično pomoč, nasvete, potrpežljivost in za vse trenutke, ki jih je preživela z mano tekom uvajanja v delo s celičnimi kulturami. Pridobila sem ogromno delovnih izkušenj, za kar sem nadvse hvaležna.

Hvala recenzentki, doc.dr. Tanji Kunej za strokovni pregled naloge.

Zahvala gre tudi Nini Kovačič za pomoč pri prevajanju izvlečka in vsem tistim, ki ste mi kakorkoli pomagali pri nastajanju diplomskega dela.

Dolgoletni prijateljici in cimri Maji se zahvaljujem za vse lepe trenutke, ki sva jih preživeli skupaj.

Hvala tudi vam, dragi prijatelji, sorodniki, člani Pihalnega orkestra Občine Šentjernej ... hvala za to, kar ste. Brez vas bi bilo veliko težje.

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

POPOTNIK

Ko hodiš,
pojdi zmeraj do konca.

Spomladi do rožne cvetice,
poleti do zrele pšenice,
jeseni do polne police,
pozimi do snežne kraljice,
v knjigi do zadnje vrstice,
v življenju do prave resnice,
a v sebi - do rdečice
čez eno in drugo lice.

A če ne prideš ne prvič ne drugič
do krova in pravega kova,
poskusi
VNOVIČ
IN ZOPET
IN ZNOVA ...

(Tone Pavček)