

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kristina SUHADOLC

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA
ADHERENTNIH CELIC CD34+ IZ POPKOVNIČNE
KRVI IN KOSTNEGA MOZGA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kristina SUHADOLC

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA ADHERENTNIH CELIC
CD 34+ IZ POPKOVNIČNE KRVI IN KOSTNEGA MOZGA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION ADHERENT CD34+
CELLS DERIVED FROM UMBILICAL CORD BLOOD AND BONE
MARROW**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v Laboratoriju za pretočno citometrijo in Laboratoriju za celično biologijo na Zavodu 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, univ. dipl. biol. in za recenzentko doc. dr. Tanjo Kunej, univ. dipl. biol. Naknadno je bila za somentorico diplomskega dela imenovana dr. Elvira Maličev.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: doc. dr. Miomir KNEŽEVIC
Biohramba d.o.o, Trzin

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

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

Datum zagovora:

Izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Kristina SUHADOLC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 602.9:611.018:577.2(043.2)=163.6
KG krvotvorne matične celice/popkovnična kri/kostni mozeg/omnici/omnomagnetna izolacija/pretočna citometrija
AV SUHADOLC, Kristina
SA KNEŽEVIČ, Miomir (mentor)/MALIČEV, Elvira (somentor)
KZ SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2011
IN IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA ADHERENTNIH CELIC CD34+ IZ POPKOVNIČNE KRVI IN KOSTNEGA MOZGA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XV, 63 str., 8 pregl., 31 sl., 2 pril., 136 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI Matične celice so nezrele, primitivne celice, podobne majhnim limfocitom, ki imajo velik potencial neomejenega samoobnavljanja, diferenciacije v specializirane celice in plastičnosti. V kostnem mozgu odraslega človeka in popkovnični krvi se nahaja več vrst matičnih celic. Zadnje raziskave kažejo, da se med njimi nahaja tudi subpopulacija adherentnih krvotvornih matičnih celic, imenovanih omnici (angl. omnicyte), ki predstavljajo manj kot 1% vseh celic CD34+. Izražajo površinske označevalce, kot so CD34, CD133, c-met in CD90 ter so negativne za označevalce CD38, CD33, HLA/DR, CD19 in CD3. V diplomski nalogi smo želeli dokazati obstoj teh celic v kostnem mozgu odraslega in v popkovnični krvi. Iz vzorcev kostnega mozga in popkovnične krvi smo osamili mononuklearne celice z gradientnim centrifugiranjem ter uporabili pozitivno imunomagnetno selekcijo za izolacijo celic CD34+. S pretočno citometrijo smo določili število mononuklearnih celic, delež celic CD34+ pred in po izolaciji, izračunali uspešnost izolacije ter testirali ali imunomagnetna izolacija vpliva na viabilnost celic. Nato smo na adherentnih celicah z imunofluorescentnim barvanjem površinskih označevalcev dokazali antigene CD133 in CD90. Na koncu smo naredili še primerjavo vsebnosti celic CD34+ med popkovnično krvjo in kostnim mozgom. Dobavljeni rezultati kažejo na to, da se v kostnem mozgu odraslih oseb in v popkovnični krvi nahajajo adherentne krvotvorne matične celice. Z nadaljnji raziskavami bi bilo potrebno preveriti še njihov potencial diferenciacije v druge tipe celic, ki bi jih v prihodnosti lahko uporabili v regenerativni medicini.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DD UDC 602.9:611.018:577.2(043.2)=163.6
CX hematopoietic stem cell/umbilical cord blood/bone marrow/omnicyte/
immunomagnetic isolation/flow cytometry
AU SUHADOLC, Kristina
AA KNEŽEVIČ, Miomir (supervisor)/MALIČEV, Elvira (co-supervisor)
PP SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in
Biotechnology
PY 2011
TI ISOLATION AND CHARACTERIZATION ADHERENT CD 34+ CELLS
DERIVED FROM UMBILICAL CORD BLOOD AND BONE MARROW
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XV, 63 p., 8 tab., 31 fig., 2 ann., 136 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Stem cells are unspecialized, primitive cells, similar to small lymphocytes, which have great potential of self regeneration, plasticity and differentiation into a variety of specialized cells. Many different stem cell types can be found in adult human bone marrow and umbilical cord blood. Recent studies indicate that a subpopulation of adherent hematopoietic stem cells, omnicytes can be found among other cells in the bone marrow and cord blood. These cells are rare and comprised less than 1% of the total CD34+ population. They can be characterised as CD34+, CD133+, c-met+, CD90+, CD38-, CD33-, HLA / DR-, CD19- and CD3-. The purpose of this thesis is to prove existence of their function in the bone marrow of an adult human and in the umbilical cord blood. After collection of the bone marrow and cord blood samples, isolation of mononuclear cells was performed using density gradient centrifugation and immunomagnetic positive selection for isolation of CD34+ cells. The number of mononuclear cells, proportion of CD34+ cells before and after isolation, calculation of isolation effectiveness and affect of immunomagnetic isolation on cell viability, were all determined with flow cytometry. Immunofluorescence staining of surface markers on adherent cells followed, to confirm antigen CD133 and CD90. Last, the comparison of CD34 + cell content between umbilical cord blood and bone marrow was made. Our results show that a subpopulation of adherent hematopoietic stem cells exist in adult human bone marrow and cord blood. In the future some additional analyses would be necessary to examine their potential for differentiation into other cell types, which could be used in regenerative medicine.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key word documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli	XII
Slovarček	XV
1 UVOD	1
1.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI MATIČNIH CELIC	1
1.2 NAMEN DELA	4
1.3 HIPOTEZA	4
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 MATIČNE CELICE V POPKOVNIČNI KRVI	5
2.1.1 Krvotvorne matične celice	6
2.1.1.1 Omniciti	8
2.1.2 Progenitorske matične celice	10
2.1.2.1 Endotelijске progenitorske matične celice	10
2.1.2.2 Krvotvorne progenitorske matične celice	10
2.1.2.3 Mezenhimske progenitorske matične celice	11
2.1.3 Mezenhimske matične celice	11
2.1.4 Embrionalnim matičnim celicam podobne celice	12
2.1.5 Celice VSEL	13
2.2 MATIČNE CELICE V KOSTNEM MOZGU	13
2.2.1 Hemangioblast	14
2.2.2. Multipotentne prednice odraslega	14
2.2.3 Celice MIAMI	15
2.2.4 Celice hMASC	15

2.3 ZDRAVLJENJE Z MATIČNIMI CELICAMI	15
 2.3.1 Zgodovina presajanja KMC v svetu	17
2.3.1.1 Presajanje kostnega mozga	17
2.3.1.2 Presajanje KMC iz periferne krvi	18
2.3.1.3 Presajanje KMC iz popkovnične krvi	19
 2.3.2 Zgodovina presajanja KMC v Sloveniji	19
2.3.2.1 Presajanje kostnega mozga	19
2.3.2.2 Presajanje KMC iz periferne krvi	20
2.3.2.3 Presajanje KMC iz popkovnične krvi	20
3 METODE IN MATERIALI	21
3.1 POTEK DELA	21
3.2 METODE	22
3.2.1 Pridobivanje vzorcev popkovnične krvi in kostnega mozga	22
3.2.2 Izolacija mononuklearnih celic	22
3.2.3 Določanje števila izoliranih celic	23
3.2.4 Izolacija celic CD34+ iz vzorca MNC z Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System	24
3.2.5 Izolacija celic CD34+ iz vzorca MNC z Indirect CD34 MicroBead Kitom	26
3.2.6 Identifikacija in karakterizacija celic CD34+ s pretočno citometrijo	28
3.2.7 Določanje viabilnosti celic s pretočnim citometrom	30
3.2.8 Izolacija adherentnih celic CD34+	30
3.2.9 Barvanje fenotipskih označevalcev	31
3.2.10 Identifikacija adherentnih celic CD34+ pod fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom	31
3.3 MATERIALI, REAGENTI IN APARATURE	31
3.3.1 Materiali	31
3.3.2 Reagenti	32
3.3.3 Aparature	32

4 REZULTATI	34
4.1 IZOLACIJA MONONUKLEARNIH CELIC	34
4.2 IMUNOMAGNETNA IZOLACIJA CELIC CD34+	34
4.3 IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA CELIC CD34+ S PRETOČNO CITOMETRIJO	35
4.4 DOLOČANJE VIABILNOSTI CELIC CD34+ S PRETOČNIM CITOMETROM	38
4.5 BARVANJE FENOTIPSKIH OZNAČEVALCEV IN ANALIZA POD FAZNO KONTRASTNIM FLUORESCENTNIM MIKROSKOPOM	42
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	44
5.1 RAZPRAVA	44
5.2 SKLEPI	49
6 POVZETEK	50
7 LITERATURA	52
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Antigeni, značilni za KMC (Weissman, 2006; Martin-Rendon in Watt, 2003; Beare in sod., 2008).	7
Preglednica 2: Citokini in diferenciacija omnicitov v različne celične tipe (Gordon in Habib, 2005).	9
Preglednica 3: Seznam nekaterih bolezni, ki jih zdravijo z matičnimi celicami in jih je odobrila FDA-Food and Drug Administration (Smith in sod., 2006).	16
Preglednica 4: Terapije z matičnimi celicami, ki so v fazi kliničnih raziskav (Clinical Trials. gov).	16
Preglednica 5: Eksperimentalno zdravljenje z matičnimi celicami, ki poteka na živalih ali na celičnih kulturah.	17
Preglednica 6: Seznam uporabljenih materialov.	31
Preglednica 7: Seznam uporabljenih reagentov.	32
Preglednica 8: Seznam uporabljenih aparatur.	32

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Asimetrična delitev matičnih celic (Baker in sod., 2010).	2
Slika 2: Blastocista (Human Embryonic Stem Cells ... , 2009).	3
Slika 3: Diferenciacija in specializacija celic (Malvorh, 2005).	3
Slika 4: Diferenciacija krvotvornih matičnih celic (Domen in sod., 2006).	6
Slika 5: Identifikacija površinskih označevalcev s pomočjo fluorescentnih značk (Stem..., 2001: E-2).	8
Slika 6: Mezenhimske matične celice izolirane iz popkovnične krvi (Lee in sod, 2004).	12
Slika 7: Embrionalnim matičnim celicam podobne celice iz popkovnične krvi (McGuckin in sod, 2006).	13
Slika 8: Shema poteka dela.	21
Slika 9: Izolacija mononuklearnih celic z raztopino Lympholyte®-H. Levo je prikazana plast popkovnične krvi nad sredstvom Lympholyte®-H pred centrifugiranjem in desno ločene plasti celic po centrifugiranju (McGuckin in sod, 2008).	23
Slika 10: Mreža Bürker-Türkove ploščice s podatki o velikosti komor (Cell counting slides, 2010).	24
Slika 11: Magnetno stojalo (Invitrogen, 2010).	25
Slika 12: Magntetni delci – Dynabeads (Netterwald, 2008).	25
Slika 13: Shematski prikaz ločevanja celic CD34+ z uporabo Dynal CD34 Progenitor Cell Selection System (Invitrogen, 2007).	26
Slika 14: Kolona LS (Miltenyi Biotech, 2010).	27
Slika 15: Magnetno stojalo (Miltenyi Biotech, 2008).	27
Slika 16: Shematski prikaz ločevanja CD34+ celic z uporabo sistema MACS (Miltenyi Biotec, 2008).	28
Slika 17 Shematski prikaz pretočnega citometra (Rahman, 2006).	28

Slika 18:	Komora za barvanje (Chamber slide, 1997).	30
Slika 19:	Celice CD34+ izolirane z Dynal CD34 Progenitor Cell Selection System.	34
Slika 20:	Celice CD34+ izolirane z Indirect CD34 MicroBead kitom.	35
Slika 21:	Koncentracija MNC/mL v kostnem mozgu pred in po izolaciji z Indirect CD34 MicroBead kitom.	36
Slika 22:	Koncentracija MNC/mL v popkovnični krvi pred in po izolaciji z Indirect CD34 MicroBead Kitom.	36
Slika 23:	Delež celic CD34+ v kostnem mozgu pred in po izolaciji z Indirect CD34 MicroBead kitom.	37
Slika 24:	Delež celic CD34+ v popkovnični krvi pred in po izolaciji z Indirect CD34 MicroBead Kitom.	37
Slika 25:	Izkoristek izolacije celic CD34+ iz popkovnične krvi in kostnega mozga.	38
Slika 26:	Analiza viabilnosti celic CD34+ v popkovnični krvi pred izolacijo (slika A in C) in po izolaciji z imunomagnetki (slika B in D).	39
Slika 27:	Analiza viabilnosti celic CD34+ v kostnem mozgu pred izolacijo (slika A in C) in po izolaciji z imunomagnetki (slika B in D).	40
Slika 28:	Viabilnost celic CD34+ v kostnem mozgu pred in po imunomagnetni izolaciji.	41
Slika 29:	Viabilnost celic CD34+ v popkovnični krvi pred in po imunomagnetni izolaciji.	41
Slika 30	Adherentne celice CD34+ izolirane iz popkovnične krvi (slika A), označene s celičnim označevalcem CD133 (slika C) in CD90 (slika D). Slika B prikazuje negativno kontrolo.	42
Slika 31:	Adherentne celice CD34+ izolirane iz kostnega mozga (slika A), označene s celičnim označevalcem CD133 (slika C) in CD90 (slika D). Slika B prikazuje negativno kontrolo.	43

KAZALO PRILOG

Priloga A: Izjava o poučenosti in privolitev za darovanje popkovnične krvi

Priloga B: Izjava o poučenosti in privolitev za darovanje kostnega mozga

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

7-AAD	amino aktinomicin D (angl. 7-amino-actinomycin D)
BSA	goveji serumski albumin (angl. Bovine serum albumin)
CBE	embrionalni matični celici podobna celica iz popkovnične krvi (angl. Cord blood-derived Embryonic-like Stem Cell)
CD	označevalec pripadnosti (angl. Cluster of differentiation)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNK	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic acid; DNA)
DMSO	dimetil sulfoksid (angl. Dimethyl sulfoxide)
D-PBS	Dulbeccov fosfatni pufer s soljo (angl. Dullbeco's phosphate buffered saline)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
EMC	embrionalna matična celica
EPC	endotelijalne predniške celice (angl. Endothelial Progenitor Cells)
ESC-A	embrionalne matične celice odraslega (angl. Embryonic Stem Cells of the Adult)
FACS	ločevalnik fluorescenčno označenih celic (angl. Fluorescence activated cell sorter)
FALS	fotodetektor (angl. Forward angle light scatter)
FBS	fetalni goveji serum (angl. Fetal bovine serum)
FCS	prednje sipanje (angl. Forward scatter)
FITS	fluorescin-izotiocianat (angl. Flourescein isothiocyanate)
G-CSF	granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik (angl. Granulocyte colony-stimulating factor)
GM-CSF	granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (angl. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
GvDH	bolezen presadka proti gostitelju (angl. Graft vs. host disease)

FSC	prednje sipanje svetlobe (angl. Forward scatter)
HLA	humani levkocitni antigen (angl. Human leukocyte antigen)
hMASC	humana multipotentna matična celica odraslega (angl. Human multipotent adult stem cell)
ICM	notranja celična masa (angl. Inner cell mass)
IL-3	interlevkin 3
KLH	hemocianinski površinski označevalec (angl. Keyhole limpet hemocyanin)
KM	kostni možeg (angl. Bone marrow)
KMC	krvotvorna matična celica (angl. Hematopoietic Stem Cells)
MAPC	multipotentna prednica odraslega (angl. Multipotent Adult Progenitor Cell)
MC	matična celica
MHC	poglavitni histokompatibilni kompleks (angl. Major histocompatibility complex)
MIAMI	angl. Marrow isolated multilineage inducible cell
MMC	mezenhimska matična celica (angl. Mesenchymal Stem Cell)
MNC	mononuklearna celica (angl. Mononuclear cell)
Oct-4	oktamer 4 (angl. Octamer-binding transcription factor 4)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction)
PE	fikoeritrin (angl. Phycoerythrin)
PerCP	peridinin klorofil (angl. Peridinin chlorophyll protein)
PK	popkovnična kri
RALS	fotodetektor (angl. Right angle light scatter)
Rex-1	RNA eksonukleaza 1 (angl. RNA exonuclease 1)
RPMI	osnovni medij za celične kulture (angl. Roswell Park Memorial Institute)

RT-PCR	reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (angl. Reverse transcription polymerase chain reaction)
SCF	dejavnik matičnih celic (angl. Stem cell factor)
Sox-2	angl. Sex determining region Y-box2
SSC	stransko sisanje svetlobe (angl. Side scatter)
SSEA	angl. Stage-specific embryonic surface antigen
VSEL	zelo majhne celice, podobne embrionalnim celicam (angl. Very Small Embryonic-like Stem Cells)

SLOVARČEK

Pojem	Razlaga
Adherentne celice	Celice, ki se pri gojenju pritrdijo na podlago oz. dno gojilne posode.
Alogenski	Tkivo, celice ali organ drugega osebka iste biološke vrste, ki pa je genetsko različen in zato tudi imunsko neskladen.
Asimetrična celična delitev	Celična delitev, pri kateri nastaneta dve različno diferencirani hčerinski celici, od katerih je ena enaka svoji prednici in ohranjuje njeni matični znaki, druga pa je bolj diferencirana.
Avtologen	Tkivo, celice ali organ, ki jih presadimo istemu osebku, ki jih je daroval.
Blastocista	Stopnja embrionalnega razvoja zarodka tik pred koncem brazdanja, pri človeku je to 4. -5. dan po oploditvi, sestavlja jo od 80 – 150 celic.
Bolezen presadka proti dajalcu (GvHD)	Nezaželeno stanje, do katerega lahko pride po presaditvi alogenskega kostnega mozga ali kakšnega drugega organa oz. tkiva, pri katerem imunske celice darovalca napadejo celice prejemnika.
CD	Sistem za enotno označitev antigenov celične površine (predvsem levkocitov) z monoklonskimi protitelesi.
Celica prednica (sin. prekurzorska celica)	Izraz za vsako delečo se celico, ki se lahko razdeli in diferencira v vsaj dve različni hčerinski celici.
Celično zdravljenje	Zdravljenje s presaditvijo različnih celičnih vrst. Pri tem po navadi matične celice usmerimo v razvoj v različnih končno diferenciranih celičnih tipov, ki jih potrebujemo, da z njimi popravimo okvarjene celice ali tkiva.
CFU (Kolonijska enota)	Kolonijska enota predstavlja celo kolonijo bakterij ali drugih celic, ki izhajajo iz ene same celice prednice.
Citaferesa	Citaferesa je odstranitev določene celične sestavine iz krvi.
Citokini	Citokini so heterogena skupina topnih proteinov in peptidov, ki v nanomolarnih in pikomolarnih koncentracijah delujejo kot humoralni regulatorji in v normalnih ali patoloških razmerah urejajo delovanje tkiv in celic.
DAPI	DAPI ali 4,6-diamidino-2-fenilindol je flurescentno barvilo, ki se močno veže na DNA. Uporabljajo ga pri flurescenčni mikroskopiji za označevanje jedra celice. Ker prehaja skozi nepoškodovano celično membrano, lahko z njim barvamo žive ali fiksirane celice.
Dediferenciacija	Proces, v katerem se diferencirane somatske celice vrnejo v manj diferencirano, multipotentno stanje.
Diferenciacija	Proces, v katerem se manj specializirana celica razvije v bolj specializirano.

Embrionalna matična celica (EMC)	Pluripotentne matične celice, ki jih najdemo v zgodnjem zarodku – blastocisti in jih lahko izoliramo iz notranje celične mase, preden ta začne v procesu gastrulacije tvoriti klične liste.
Embrionalnim matičnim celicam podobne celice	Skupina matičnih celic, ki jih opazujemo v tkivih ploda ali odraslega človeka in verjetno razvojno izhajajo iz notranje celične mase blastociste. Izražajo lastnosti embrionalnih matičnih celic in so pluripotentne (ESC-A, VSEL, MASC, MAPC, MIAMI).
Fetalni goveji serum	Običajen dodatek k gojiščem za gojenje celic, ki se pridobiva iz seruma nerojenih telet. Vsebuje razne rastne dejavnike.
<i>In vitro</i>	In vitro je besedna zveza, ki se v naravoslovju nanaša na procese v epruveti oziroma v umetnem okolju (laboratoriju).
<i>In vivo</i>	V živem osebku oz. v naravnem okolju.
Kostni mozeg	Mehko tkivo, ki se nahaja v dolgih kosteh. Kostni mozeg vsebuje med različnimi odraslimi celicami tudi več vrst matičnih celic, npr. mezenhimske, krvotvorne in druge matične celice.
Krvotvorna matična celica (KMC)	Je multipotentna matična celica v kostnem mozgu, iz katere nastanejo eritrociti, levkociti in trombociti.
Limfatična krvotvorna matična celica	Prednška multipotentna krvotvorna matična celica, ki se lahko razvije v celice limfatične vrste (limfocite T in B ter NK-celice).
Multipotentna celica prednica odraslega (MAPC)	Vrsta pluripotentnih celic iz kostnega mozga, ki imajo določene lastnosti embrionalnih matičnih, ki jih lahko diferenciramo v hondrocite, adipocite in kostne celice.
Matična celica	Matična celica (MC) je nediferencirana celica v živih bitjih, ki ima dve ključni lastnosti: lastnost samoobnavljanja in lastnost pluripotentnosti.
Mieločna krvotvorna matična celica	Multipotentna krvotvorna matična celica, ki se lahko razvije v eritrocite, trombocite, granulocite, makrofage, monocite in dendritične celice.
Mononuklearne celice	Enojedrne celice. Skupno ime za več vrst celic krvotvornega sistema, ki jih imenujejo tudi mononuklearni levkociti in se ločijo od ostalih levkocitov (granulocitov) po tem, da ne vsebujejo granul (agranulociti) in da imajo okroglo, nesegmentirano jedro. Vključujejo limfocite, plazmatke, monocite in makrofage ter različne vrste matičnih celic.
Multipotentna matična celica	Je celica z manjšo potentnostjo in sposobnostjo diferenciacije v primerjavi s pluripotentno in totipotentno matično celico. Multipotentna celica lahko tvori različne tipe celic, ki pa vsi pripadajo istemu kličnemu listu.
Notranja celična masa (sin. embrioblast)	Notranja skupina celic v blastocisti, ki nastane okrog 5. dne po oploditvi, iz katerih lahko osamimo embrionalne matične celice.
Oligopotentna matična celica	Celica, sposobna tvoriti dve ali več različnih celičnih linij znotraj tkiva.

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.
Pluripotentna matična celica	Celica, sposobna tvoriti vse telesne celice, vključno z germinalnimi celicami.
Poglavitni histokompatibilnostni kompleks (MHC)	Področje v genomu sesalcev, ki kodira površinske antogene na celicah, ki sodelujejo pri imunskega odziva. MHC je pomemben pri ločevanju lastnih molekul od tujih. Pri človeku se MHC imenuje HLA.
Popkovnična kri	Kri, zbrana iz popkovnične vene ali dveh popkovničnih arterij takoj po porodu. Vsebuje predvsem krvotvorne matične celice ter predniške celice eritrocitov, levkocitov in trombocitov, v manjši meri pa tudi nekaj drugih vrst matičnih celic.
Površinski označevalci	Proteini na površini celice, ki so značilni za določen tip celic. Zaznamo jih z uporabo barvil, z barvili označenih protiteles ali z drugimi detekcijskimi metodami.
Predniška celica	Hčerinska celica, usmerjena potomka matične celice v direktni liniji. Je že delno diferencirana celica, ki je lahko tudi celica prednica različnim, bolj diferenciranim celičnim tipom celic. Iz nje nastanejo nove celice po seriji celičnih delitev.
Pretočni citometer	Ločevalnik fluorescenčno označenih celic. Naprava, ki lahko hitro ločuje celice v suspenziji glede na njihovo velikost ali barvo, s katero so označene. Uporabljamo jo za štetje določenih vrst celic ali za njihovo sortiranje.
Regenerativna medicina	Veja medicine, ki se ukvarja z obnovo fizioloških funkcij organov in tkiv in pri tem lahko uporablja tudi <i>in vitro</i> gojene celice, metode tkivnega inženirstva, različne naravne rastne dejavnike in druge biotehnološke metode.
Samoobnavljanje	Posebna sposobnost matične celice, da s celično delitvijo nastane vsaj ena hčerinska celica, ki je popolnoma enaka materinski in ima enako latentno sposobnost diferenciacije.
Telomeraza	Ensim v evkariontskih celicah, ki podaljšuje konci kromosomov (telomere) ob cekičnih delitvah. Tako preprečuje njihovo degeneracijo oz. staranje.
Totipotentna matična celica	Celica, sposobna tvoriti celoten organizem vključno z ekstraembrionalnim tkivom (trofoblast).
Transdeterminacija	Proces, pri katerem se predniške matične celice ene usmeritve nenadoma spremenijo v celice druge predniške usmeritve, npr. iz mezodermalnih nastanejo ektodermalne prednice.
Transdiferenciacija	Proces, pri katerem se tkivne matične celice iz enega tkiva odraslega diferencirajo v specializirane celice drugega tkiva.
Unipotentna celica	Celica, ki je sposobna le razvoja v eno celično linijo.

(Rožman in Jež, 2010)

1 UVOD

Že v 70. letih prejšnjega stoletja se je začela razvijati nova veja raziskovalne dejavnosti imenovana regenerativna medicina. Glavni namen je bil razvoj novih terapij, ki bi omogočale zamenjavo poškodovanih tkiv in organov človeškega telesa. Kot najbolj obetavne možnosti so se izkazale transplantacija matičnih celic, transplantacija tkiva vzgojenega v laboratoriju in izolacija lastnih matičnih celic. Matične celice naj bi bile za regeneracijo poškodovanih tkiv in organov primernejše od večine dosedanjih oblik terapije, saj so sposobne obnove tkiva v širšem obsegu in za daljše časovno obdobje. Bistvo regenerativne medicine je torej v odvzemu dela matičnih celic iz telesa, kultivacija v želeno tkivo in njihova transplantacija na področja obolelih tkiv, kjer nadomestijo nedeljujoča ali prizadete dele telesa. Glavni problem matičnih celic je kontrolirana in usmerjena diferenciacija. Če diferenciacija *in vitro* ne bi bila dovolj natančna, bi lahko celice po implantaciji tvorile teratome, ali pa se diferencirale v napačno tkivo. Na diferenciacijo celic v živem organizmu vplivajo številni dejavniki, kot so hormoni, rastni faktorji, medcelični stiki in okolje.

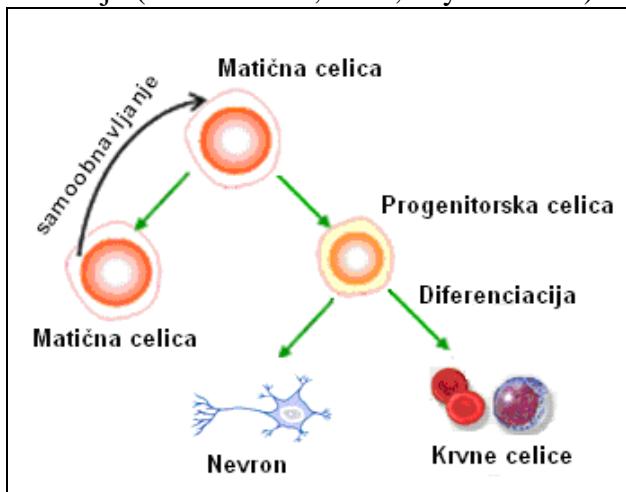
Danes je raziskovanje matičnih celic in širjenje človekovih spoznanj o njih in možnostih njihove uporabe za zdravljenje eno od najbolj raziskovanih področij v medicini. Že danes lahko zdravimo določene onkološke, hematološke in proliferativne bolezni, dedne imunske in metabolne motnje ter mehanske poškodbe tkiv in organov. Napredek medicinske znanosti pa obeta zdravljenje bistveno širšega kroga bolezni.

1.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI MATIČNIH CELIC

Matične celice so nezrele primitivne celice, po obliki podobne majhnim limfocitom, ki imajo velik potencial neomejenega samoobnavljanja, diferenciacije v specializirane celice in plastičnosti. Glede na izvor razdelimo matične celice na embrionalne, fetalne in matične celice odraslega. Embrionalne matične celice izvirajo iz notranje celične mase v blastocisti (slika 2), ki nastane 5 do 7 dni po oploditvi. So pluripotentne in iz njih se razvijejo vse celice v odraslem osebku. Fetalne matične celice najdemo v zarodku in v popkovnični krvi, matične celice odraslega pa se nahajajo v vseh tkivih odraslega človeka. Te celice so multipotentne (Choumerianou in sod., 2008; Herberts in sod., 2011).

Matične celice se samoobnavljajo z asimetrično celično delitvijo (slika 1), pri čemer na eni strani tvorijo identične kopije celic, na drugi strani pa tvorijo nove linije bolj diferenciranih celic. Pri tem najprej nastanejo celice prednice (prekurzorji) specializiranih tkivnih celic in iz njih nato funkcionalne celice tkiv. Na ta način število matičnih celic ostaja konstantno, nadaljnja delitev ene hčerinske celice pa omogoča hitro razširitev populacije diferenciranih celic glede na potrebe (Knoblich, 2008). V nasprotju z njimi pa imajo diferencirane celice omejeno število delitev ter z večanjem diferenciacije se jim zmanjša tudi njihova zmožnost samoobnavljanja. Z vsako celično delitvijo se telomere človeških somatskih celic skrajšajo. Kritično kratke telomere celični popravljalni mehanizmi spoznajo kot okvarjeno DNA in zaustavijo celično delitev. Celice vstopijo v obdobje senescence in odmrejo. Matične celice pa vzdržujejo nespremenjeno dolžino telomer, kar omogoča njihovo samoobnavljanje. Ugotovili so, da je v njih prisoten aktivен encim telomeraza, ki nadomesti izgubo koncov kromosomov med vsako celično delitvijo z njihovo ponovno sintezo. Imajo pa tudi številne

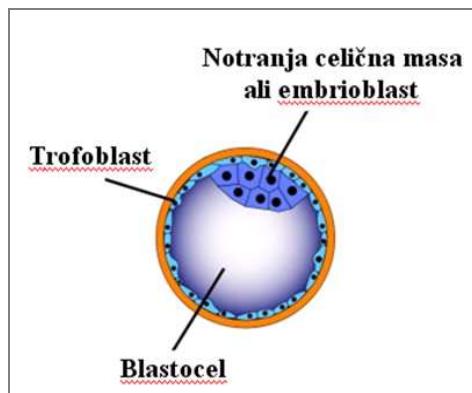
aktivne gene, ki kodirajo popravljalne mehanizme DNA. S tem se do neke mere preprečijo genetske napake, ki nastanejo pri velikem številu podvojevalnih ciklov med samobnavljanjem in diferenciacijo (Luzar in sod., 2000; Hiyama 2007).



Slika 1: Asimetrična delitev matičnih celic (Baker in sod., 2010)

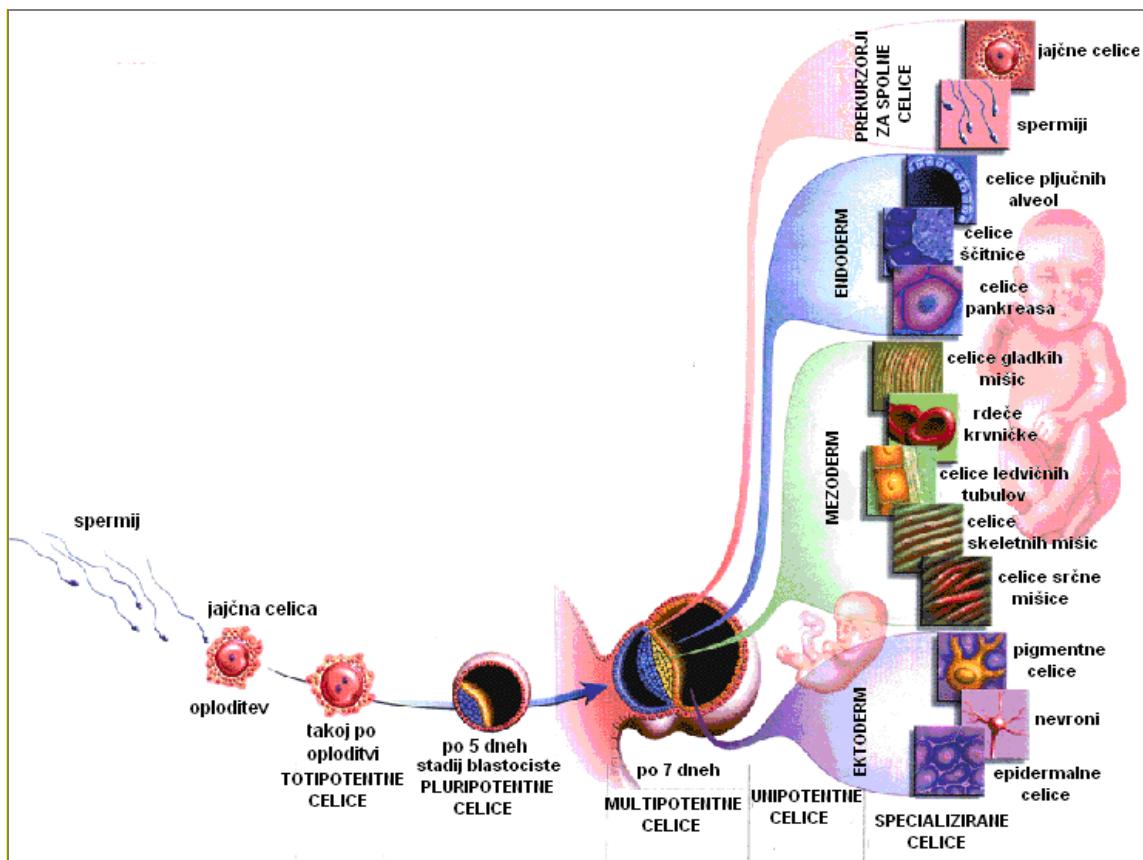
Pomembna lastnost matičnih celic je tudi plastičnost, ki jim omogoča, da se lahko razvijejo v več kot 200 različnih vrst celic, ki tvorijo različne organe človeškega telesa. Plastičnost matičnih celic je sestavljena iz štirih elementov, in sicer: iz sposobnosti za dediferenciacijo, tj. za razvoj odrasle ali linijsko usmerjene celice prednike v bolj primitivne oblike, iz sposobnosti za transdeterminacijo; tj. preskoka v drugo prednisko celično linijo, iz sposobnosti za transdiferenciacijo, tj. sposobnosti, ki omogoči diferencirani celici, da pridobi fenotipske značilnosti druge diferencirane celice, ter celo iz sposobnosti za fuzijo z drugimi, že diferenciranimi celicami v tkivu, iz česar nastane popolnoma nova celična vrsta (Martin-Rendon in Watt, 2003; Verfaillie, 2005; Strbad in Rožman, 2005).

Glede na stopnjo diferenciacije ločimo matične celice na totipotentne, pluripotentne, multipotentne in unipotentne. Totipotentne matične celice so celice, ki nastanejo takoj po oploditvi in so se sposobne diferencirati v vse celične vrste, vključno s spermiji in jajčeci (slika 3). Ena totipotentna celica se lahko razvije v celoten organizem (Choumerianou in sod., 2008). Pluripotentne matične celice so že bolj specializirane in so se sposobne diferencirati v vse tri zarodne plasti: mezoderm, ektoderm in endoderm (slika 3) ne pa v trofoblast (slika 2). To je v del blastociste, ki se vgnezdi v steno maternice in se kasneje razvije v posteljico (Kondo in sod., 2003; Choumerianou in sod., 2008).



Slika 2: Blastocista (Human Embryonic Stem Cells ... , 2009)

Multipotentne matične celice se še zmeraj lahko razvijejo v različne celične tipe, vendar so omejene na celične tipe znotraj svoje zarodne plasti (slika 3). Take so npr. mieloidne krvotvorne matične celice. Unipotentne matične celice pa so se sposobne diferencirati le v eno celično vrsto. Imenujemo jih tudi celice prednice ali progenitorji (Choumerianou in sod., 2008).



Slika 3: Diferenciacija in specializacija celic (Malvorh, 2005)

1.2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je vzpostaviti protokol za ovrednotenje vsebnosti matičnih celic omnicitov v popkovnični krvi in kostnem mozgu. V popkovnični krvi in kostnem mozgu smo žeeli preveriti vsebnost omnicitov in določiti, katera metoda bi bila najprimernejša za njihovo izolacijo. Žeeli smo tudi preizkusiti, če je mogoče iz kostnega mozga in popkovnične krvi z uporabo imunomagnetne selekcije učinkovito izolirati omnicide ter jih okarakterizirati z imunobarvanjem fenotipskih označevalcev.

1.3 HIPOTEZA

Naša delovna hipoteza je bila, da se v popkovnični krvi in kostnem mozgu nahaja subpopulacija krvotvornih matičnih celic, z imenom omnici, ki se med gojenjem pritrđijo na plastično ali stekleno podlago.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MATIČNE CELICE V POPKOVNIČNI KRVI

Matične celice iz popkovnične krvi (PK) so neonatalne matične celice, ki veljajo za mlajše od matičnih celic odraslih tkiv. So manj zrele kot matične celice, ki jih najdemo v kostnem mozgu (KM) ali organih odraslih ali otrok. Čeprav največji del matičnih celic predstavlja krvotvorne matične celice (KMC), pa popkovnična kri v manjših količinah vsebuje tudi mezenhimske in različne progenitorske matične celice ter v zadnjem času odkrite embrionalnim matičnim celicam podobne celice-CBE (McGuckin in sod., 2005) in zelo majhne celice podobne embrionalnim matičnim celicam-VSEL (Ratajczak in sod., 2007; Kucia in sod., 2007a; Kucia in sod., 2007b; Kucia in sod., 2008).

V PK je prisotnost zrelih KMC prvi odkril Knudtzon leta 1974 (Knudtzon, 1974), deset let kasneje pa je Ogawa s sodelavci dokazal tudi prisotnost primitivnih KMC (Nakahata in Ogawa, 1982; Leary in Ogawa, 1987; Mayani in sod. 1998).

Zaradi bioloških in drugih značilnosti ima PK v primerjavi s kostnim mozgom ali KMC iz periferne krvi več prednosti npr. lažja dostopnost in manjše tveganje za prenos virusnih okužb, saj v PK praviloma ni virusov, ki se pogosto pojavljajo v kostnem mozgu odraslih in zmanjšujejo uspeh presaditve. Manjše je tudi tveganje za nastanek bolezni presadka proti gostitelju (GvHD) po presaditvi. Hkrati v PK ni starostno pogojenih poškodb celic. Samo pridobivanje PK pa je neinvazivno in neškodljivo za mater in otroka, saj poteka brez kakršnegakoli posega v telo. Shranjena PK je vedno na voljo, prav tako tudi ni etičnih in pravnih zadržkov za njihovo uporabo kot so pri gojenih EMC ali celicah pridobljenih s kloniranjem (Gordon in Habib 2005; Ballen, 2005; Rocha in sod., 2006; Minn in Najem, 2011; Gluckman, 2009).

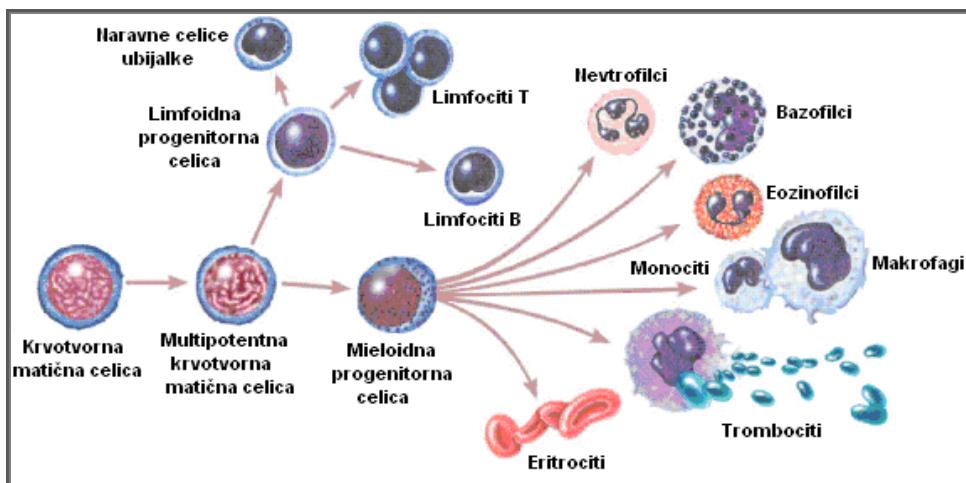
Matične celice iz PK se že uporabljajo pri zdravljenju različnih vrst raka, bolezni kostnega mozga, prirojenih motenj hemoglobina in metabolizma, prirojenih oblik imunske pomanjkljivosti in nekaterih oblikah dednih bolezni (Broxmeyer, 2010). Uporabljajo se tudi za pripravo kožnih nadomestkov, pri mehanskih poškodbah tkiva in organov oz. v regenerativni medicini. Številne raziskave kažejo tudi na možnost uporabe matičnih celic iz PK za zdravljenje nevroloških, kardiovaskularnih motenj, posledic srčne in možganske kapi, okvare jeter in diabetesa (Rocha in sod., 2006; Levičar in sod., 2007; Levičar in sod., 2008).

Pomanjkljivost PK je majhno število krvotvornih matičnih celic. Za presaditev potrebujejo na kilogram telesne teže približno 100.000 matičnih celic, kar zadostuje le za otroke in osebe s telesno težo pod 40 kg (Wagner, 1994; Wadlow in sod., 2002; Minn in Najem 2011). Nekateri zdravijo odrasle bolnike s presajanjem dveh različnih delno skladnih pripravkov alogenične PK (Barker in sod., 2001; Rocha in sod., 2010), oziroma poskušajo povečati število z gojenjem *in vitro*. Po drugi strani se spremljajo in raziskujejo dejavniki, ki vplivajo na število KMC v PK kot so zbiranje, predelava in shranjevanje PK. Nekateri zbirajo PK, ko je placenta *ex utero* - po njenem porodu drugi, ko je placenta *in utero*, tretji pa uporabljajo kombinacijo obeh načinov. Večina raziskav je pokazala, da je volumen zbrane popkovnične krvi večji in vsebuje večje število enonojedrnih celic pri zbiranju krvi

iz placente *in utero*. Možnost okužbe PK pa je pri tem načinu večja (Surbek in sod., 2000; Wong in sod., 2001).

2.1.1 Krvotvorne matične celice (KMC)

KMC so nediferencirane celice, ki imajo sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije v multipotentne progenitorne celice vseh limfoidnih in mieloičnih celičnih linij. Mieloična linija se diferencira v usmerjene celice kot so eritrociti, trombociti, nevtrofilci, bazofilci, eozinofilci, monociti in makrofagi; limfna vrsta pa se diferencira v limfocite B, limfocite T in naravne celice ubijalke (slika 4) (Mayani in Lansdorp, 1998; Gordon in Habib, 2005; Higuchi in sod., 2010).



Slika 4: Diferenciacija krvotvornih matičnih celic (Domen in sod., 2006)

Multipotentne KMC so sposobne tako samoobnavljanja kot tudi diferenciacije v usmerjene krvne celice, vendar je zmanjšana njihova sposobnost plastičnosti. Po več zaporednih delitvah in dozorevanju se razvijejo v zrele krvne celice, ki nato izplavajo v kri. Prav zaradi plastičnosti pa so se KMC sposobne diferencirati tudi v nekatere tipe tkiv drugih dveh zarodnih plasti mezoderma in ektoderma in sicer v: miocite, kardiomiocite, epitelne celice jeter, kože, pluč, požiralnika, v hepatocite in skeletne mišice (Gordon in Habib, 2005; Kondo in sod., 2003).

Vir KMC je kostni možeg, periferna in popkovnična kri. KMC so redke celice v kostnem možgu in preko krvi počasi krožijo po našem telesu. Njihova pogostost v kostnem možgu je 1 na 10.000-15.000 ter v periferni krvi celo 1 na 100.000 vseh krvnih celic (Domen in sod., 2006, Kondo in sod., 2003). Izplavljanje KMC iz kostnega možga v periferno kri pospešijo z filgrastimom, ki je rekombinantni dejavnik za pospešitev nastanka in dozorevanja granulocitov (G-CSF), v odmerku 5 µg/kg, subkutano v zaporedju petih dni (Papayannopoulou, 1999; Gordon in Habib, 2005). KMC pridobljene iz venske krvi, so danes skoraj popolnoma nadomestile odvzem KMC iz kostnega možga. Presaditev KMC iz venske krvi ima v primerjavi s presajanjem kostnega možga več prednosti, kot so hitrejše prijetje presadka in zgodnejši pričetek tvorbe levkocitov in trombocitov po presaditvi, zmanjšanje potrebnega nadomestnega zdravljenja s pripravki trombocitov in eritrocitov,

manjša možnost kontaminacije s tumorskimi celicami ter boljše preživetje bolnikov (Domanović, 2004; Kondo in sod., 2006).

KMC se prepozna po njihovi sposobnosti tvorbe kolonij v različnih poskusih *in vitro* in po številnih površinskih označevalcih (CD, angl. Clusters of Differentiation) s katerimi jih tudi identificiramo (Pregl. 1).

Preglednica 1: Antigeni, značilni za KMC (Weissman, 2006; Martin-Rendon in Watt, 2003; Beare in sod., 2008)

CD antigen	Struktura	Celice, ki ga izražajo	Funkcija
CD7	IgSF	krvotvorne progenitorske celice, timociti, T celice, celice naravne ubijalke (NK)	kostimulacija celic T
CD34	Sialomucin, tip I TM	prekurzorji KMC, kapilarni endotel, embrionalni fibroblasti	marker matičnih celic, adhezija, receptor CD62L
CD45	/	krvotvorne celice	tirozin fosfataza, povečuje TCR in BCR signale
CD47	IgSF	krvotvorne celice, epitelno endotelno tkivo, fibroblasti	adhezija, migracija in aktivacija levkocitov
CD50	IgSF	krvotvorne, endoteljne, epidermalne in langerhansove celice	adhezija, kostimulacija
CD55	GPI-linked	krvotvorne in endotelijske celice	veže C3b komponento, regulacija komplementa
CD58	IgSF	krvotvorne in ne krvotvorne celice	CD2 receptor, adhezija
CD59	GPI-linked	krvotvorne in ne krvotvorne celice	veže C8 in C9 komponento komplementa
CD90/Thy-1	IgSF, GPI-linked	CD34+ KMC, nevroni	diferenciacija KMC in nevronov
CD117/c-kit/SCFR	IgSF, družina RTK	krvotvorne progenitorske celice, mastocite	SCF receptor, pomemben za razvoj in diferenciacijo progenitorskih KMC
CDw123	CRSF	podskupina limfocitov, bazofilci, krvotvorni progenitorske celice, mastociti, dendritične celice, megakariociti	IL-3R α , w/ CDw131
CD124	CRSF	monociti, prekurzorji KMC, fibroblasti, epitelne celice	IL-4R α , w/ CD132 or IL-13R α , diferenciacija in rast T celic
CD133/AC133/prominin-like 1	TM5SF	KMC, epitelne in endoteljne celice	/
CD164	/	KMC, mieloične celice, epitelne celice, stromalne celice kostnega mozga	adhezija krvnih progenitvornih celic na stromalne celice

CD (cluster of differentiation) - oznaka za monoklonska protitelesa, s katerimi se dokazujojo določene značilne molekule belih krvnih celic, w-oznaka za molekulo, ki ni dobro preučena, IgSF (immunoglobulin superfamily)-imunoglobulinska družina, GPI (glycophosphatidylinositol)-glikozilfosfatidilinozitol, RTK (Receptor tyrosine kinase)-receptor s tirozin-kinazno aktivnostjo, CRSF (cytokine receptor superfamily)-družina citokinskih receptorjev, TM (transmembrane)-transmembranski, BCR (B-cell receptor)-B celični receptor, TCR (T-cell receptor)-T celični receptor.

Poleg imunološkega dokazovanja antigenov z označevalci (slika 5) lahko izolirano populacijo KMC identificiramo tudi z molekularnimi tehnikami kot so: PCR, RT-PCR ali z uporabo DNA mikromrež. Z metodo RT-PCR zasledujemo izražanje transkripcijskih dejavnikov, ki zavirajo ali aktivirajo prepisovanje genov, nadzorujejo potek hematopoeze (regulatorni geni HOX) in so vključeni v diferenciacijo (receptorji za rastne faktorje) ali pa samo v proliferacijo (Strbad, 2004).



Slika 5: Identifikacija površinskih označevalcev s pomočjo fluorescentnih značk (Stem..., 2001: E-2)

2.1.1.2 Omnici

Omnici so adherentne KMC, ki imajo sposobnost samoobnovljanja in diferenciacije v vse tri zarodne plasti (ektoderm, mezoderm in endoderm). So okrogle, majhne mononuklearne celice s premerom 7-15 µm in z visokim razmerjem jedra in citoplazme (Gordon in Habib 2005; Gordon in sod., 2006; Levičar in sod., 2007).

Izolira se jih lahko iz odraslega kostnega mozga, periferne krvi, popkovnične krvi in fetalnih jeter. So multipotentne če ne celo pluripotentne in predstavljajo manj kot 1% vseh CD34+ celic (Gordon in Habib, 2005).

Med gojenjem se pritrdijo na plastiko ali steklo in ostanejo pritrjene do 72 ur. Adherentne celice so definirane kot celice, ki so še vedno pritrjene na plastiko po 3x spiranju s PBS pufrom. Poleg omicytot se na plastiko pritrdijo tudi mezenhimske matične celice (MMC), makrofagi in monociti, vendar ne izražajo CD34+ površinskega celičnega označevalca (Gordon in Habib, 2005).

Namnožujemo jih v obogatitvenem mediju stromalnih celic, ki se jih lahko pridobi iz kostnega mozga, fetalnega timusa ali fetalnih jeter. Uporabimo lahko avtologne, alogene ali ksenogene stromalne celice. Predhodno jih je potrebno inaktivirati z gama žarki, da ustavimo njihovo rast in proliferacijo. Obogatitven medij stromalnih celic predstavlja zalogo pomembnih rastnih faktorjev (G-CSF, IL-3, SCF in GM-CSF), ki spodbujajo njihovo rast in proliferacijo (Gordon in Habib, 2005).

Omnice lahko izoliramo na več načinov: z imunomagnetnim ločevanjem, z afinitetno kromatografijo, citotoksičnimi reagenti vezanimi na monoklonsko protitelo, s "panningom" s protitelesi vezanimi na trden matriks (ploščo) in z ločevalnikom fluorescenčno označenih celic (FACS). Protitelesa so lahko konjugirana z magnetnimi delci, biotinom ali fluorokromi (Gordon in Habib, 2005).

Okarakterizirane so kot: CD34+, CD38-, CD33-, HLA/DR-, AC133+, c-met+ in Thy-1+. Vseh zgoraj naštetih individualnih površinskih označevalcev ni mogoče najti na vseh izoliranih celicah. Kljub temu pa lahko rečemo, da so izolirane celice homogene saj vse izražajo CD34+ površinski označevalec, so adherentne in imajo morfologijo podobno majhnim limfocitom (Gordon in Habib, 2005).

Omnice se lahko uporabi v raziskovalne namene npr. za detekcijo in ocenjevanje rastnih dejavnikov, ki so pomembni za regeneracijo matičnih celic; za zdravljenje genetskih bolezni (β talasemijo, anemijo srpastih celic) in okvarjenih organov s presajanjem avtolognih matičnih celic ali pa z vstavljanjem divjega gena v matično celico, ki bo nadomestil funkcijo okvarjenega gena v telesu. Prav tako jih lahko uporabimo tudi za produkcijo proteinov za terapevtske namene kot so eritropoetin, rastni faktorji, proteini, hormoni (inzulin) in sintetične proteine. Tudi brez dodanih terapevtskih genov imajo omnici še vedno terapevtsko uporabnost npr. za regeneracijo hematopoetskega sistema (Gordon in Habib, 2005; Gordon, 2008).

Omnici se lahko diferencirajo v mezenhimske, endotelijske, epitelne in dendritične celice. Celice lahko gojimo z dodajanjem različnih citokinov, odvisno od želenega celičnega tipa (pregl. 2). Diferenciacija je opazna že v manj kot šestnajstih dneh. Diferenciacijo lahko ovrednotimo vizualno, s pretočno citometrijo, RT-PCR ali z imunofenotipiziranjem (Gordon in Habib, 2005).

Preglednica 2: Citokini in diferenciacija omnicotov v različne celične tipe (Gordon in Habib, 2005)

Tkivo/organ	Citokini
živci	DMSO, butiliran hidroksianizol, izobutil metilksantin, b-FGF, FGF-8
trebušna slinavka (β celice)	bFGF, EGF, aktivin A, betacellin, HGF, nikotinamid
skeletne mišice (miocite)	EGF, PDGF, 5-azacitidin
Srce (kardiomiociti)	retinojska kislina, forskolin, norepinefrin
Jetra (hepatocite)	G-CSF, GM-CSF, IL-3, SCF, HGF in FGF
Kost (osteoblasti)	BMP-4
Hrustanec (hondrocite)	TGF-beta, BMP-6, deksametazon

DMSO-dimetl sulfoksid; FGF-fibroblastni rastni faktor; bFGF-osnovni fibroblastni rastni faktor; EGF- epidermalni rastni faktor; HGF- hepatocitni rastni faktor; PDGF- trombocitni rastni faktor; BMP- protein kostne morfogeneze; TGF- transformirajoči rastni faktor beta; G-CSF- granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik; SCF-faktor, ki vzpodbuja razvoj matične celice; GM-CSF- granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik; IL-interlevkin.

2.1.2 Progenitorske matične celice

Tako kot matične celice se tudi progenitorske celice (ang. committed progenitor cells) lahko diferencirajo v specifične celične tipe, vendar se od njih ločijo po tem, da so že linijsko usmerjene. Progenitorske celice se delijo zelo hitro, število njihovih delitev pa je omejeno. Po določenem času se razvijejo v dokončno diferencirane celice, ki se ponavadi ne delijo več in kmalu odmrejo (Domen in sod., 2006).

2.1.2.1 Endotelijalne progenitorske matične celice

Endotelijalne progenitorske celice (EPC) je prvič opisal Asahara in sod. leta 1997. Izoliral jih je iz periferne krvi na osnovi ekspresije CD34 in drugih označevalcev endotelija na površini celic (Asahara in sod., 1997). EPC sodelujejo pri nastajanju novih krvnih žil (Shin in sod. 2005; Asahara in sod., 1997). Njihovo odkritje je pripeljalo do koncepta, da vaskularizacija in angiogeneza lahko potekata simultano v postnatalnem obdobju, saj se lahko celice EPC diferencirajo v vaskularni endotelij (Rožman in Jež, 2009). Celice EPC imajo podobne lastnosti kot embrionalni angioblasti. Lahko se delijo, migrirajo in diferencirajo v zrele endotelijalne celice. Leta 2005 so jih izolirali tudi iz PK, kjer predstavljajo manj kot 1% vseh krvotvornih matičnih celic (Shin in sod., 2005). Izražajo podobne površinske označevalce KMC in sicer CD34, CD31, VEGFR-1 (angl. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1), AC133, Tie-1 in Tie-2. Izolacija, identifikacija in karakterizacija EPC je zelo težka, saj za zdaj še ni znanega specifičnega površinskega označevalca, ki bi razlikoval med EPC in KMC (Shin in sod. 2005; Ribatti, 2007).

2.1.2.2 Krvotvorne progenitorske matične celice

Poznamo dve vrsti krvotvornih progenitorskih celic in sicer limfoidne progenitorke celice in mieloidne progenitorske celice. Obe vrsti sta sposobni samoobnove in dozorevanja v usmerjene matične celice (Karsunky in sod., 2008). Izoliramo jih lahko iz kostnega mozga, vranice, jeter, popkovnične krvi, periferne krvi in drugih tkiv. Uporabimo jih lahko za transplantacije, da prejemniku nadomestimo limfoidne oz. mieloidne celice, za preiskovanje varnosti in učinkovitosti določenih zdravil, za eksperimentalni model za diferenciacijo, za vpliv različnih rastnih faktorjev na diferenciacijo ter za karakterizacijo genov, ki so vpleteni v razvoj in regulacijo limfocitnih in mieloidnih celic (Akashi in sod., 1999; Weissman in sod., 2001).

Limfoidna progenitorska matična celica je multipotentna in se diferencira v limfocite T, limfocite B in v naravne celice ubijalke. Od ostalih celic jih ločimo na podlagi značilnih celičnih označevalcev kot so CD10, CD34, CD38, CD90, CD117, CD124, CD127 in CD228. Namesto rastnih faktorjev lahko za namnoževanje uporabimo tudi stromalne celice ali celice podlage (Akashi in sod., 1999; Hao in sod., 2001). Mieloidna progenitorska matična celica je prav tako multipotentna in je prednica celicam BFU-E (eritrocitni vrsti), celicam CFU-Meg (trombocitni vrsti), celicam CFU-GM (granulocitno monocitni vrsti), celicam CFU-Eo (eozinofilni vrsti) in celicam CFU-Bas (bazofilni vrsti) (Weissman in sod., 2001). V 1 mL popkovnične krvi je med 1000 in 10.000 multipotentnih mieloidnih progenitorskih matičnih celic (Mayani in sod., 1998). Za izolacijo celic se uporablja naslednje površinske označevalce: CD33, CD34, CD110, CD111, CD112, CD117, CD123,

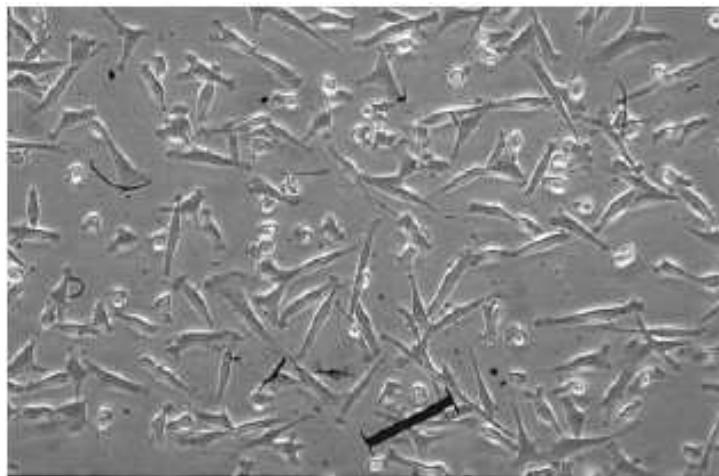
CD131, CD133, CD173, CD174, CD176, CD227, CD228 in CD280 (Weissman in sod., 2001; AbD Serotec, 2006).

2.1.2.3 Mezenhimske progenitorske matične celice

Mezenhimske progenitorske matične celice so multipotentne in jih lahko izoliramo iz kostnega mozga, sinovijske tekočine, fetalnih pljuč, maščobnega tkiva, periferne krvi in popkovnične krvi. Ne izražajo značilnih krvotvornih površinskih označevalcev kot so CD14, CD34, in CD45, so pa pozitivne na označevalce kot so CD13, CD28, CD33, CD44, CD105, CD166 in HLA-razred I. Mezenhimske progenitorske matične celice ustvarjajo potrebno mikrookolje z izločanjem različnih citokinov za proliferacijo in diferenciacijo KMC. Prav tako imajo velik terapevtski potencial, saj se lahko diferencirajo v številna mezodermalna tkiva in imajo visoko proliferativno stopnjo samoobnove (Kim in sod, 2004).

2.1.3 Mezenhimske matične celice

MMC so definirane kot samoobnavljajoče, multipotentne celice, ki imajo sposobnost diferenciacije v celice mezodermalne linije in sicer v kostno, hrustančno, mišično, maščobno, vezivno tkivo (Tocci in Forte, 2003; Herberts in sod., 2011). Pod določenimi eksperimentalnimi pogoji so sposobne preskočiti iz mezodermalne linije v ektodermalno in lahko nastanejo tako kardiomiociti kot tudi živčne celice (Jackson in sod., 2007). V človeškem kostnem mozgu jih je prvi opisal Friedenstein in sod. leta 1974 (Friedenstein in sod., 1974). Imajo dvojno vlogo, in sicer predstavljajo izvor celic za nekrvotvorana tkiva in so hkrati hranilne in podporne celice za rast in diferenciacijo krvnih celic in ostalih tkiv, saj sintetizirajo različne komponente zunajceličnega matriksa in različne rastne faktorje (Rožman in Jež, 2009; Tocci in Forte, 2003). Glavni vir MMC je kostni mozeg, nahajajo pa se tudi v drugih tkivih človeškega telesa, kot so: maščobno tkivo, PK (slika 6), horionski vili placente, amnionska tekočina, periferna kri, pljuča idr (Herberts in sod., 2011). Zavzemajo le majhen delež vseh celic v aspiratu kostnega mozga in sicer predstavljajo ob rojstvu 0,01 % celic z jedrom ter pri starosti 80 let le še 0,00001 % celic z jedrom. (Kestendjieva in sod., 2008). Med gojenjem se pritrdirjo na plastično podlago, kar omogoča enostavno izolacijo iz vzorcev kostnega mozga. V kulturi so celice zelo heterogene in imajo vretenasto obliko, podobno fibroblastom (Jackson in sod., 2007). Tudi po daljšem gojenju *in vitro* ohranijo svojo diferenciacijsko sposobnost, zato so primerne za celično zdravljenje in kot vektor za *ex vivo* gensko manipulacijo. Zaenkrat še ni znanega specifičnega označevalca, ki bi ga lahko uporabili za izolacijo, zato se uporablja naslednje pozitivne označevalce: CD 10, CD13, CD73 (SH3 in SH4), CD105 (SH2), CD29, CD44, CD90, CD106, CD166, CD271 in negativne CD14, CD34, CD38, CD45 (Rocky in sod., 2003; Jackson in sod., 2007; Cao in Feng, 2009).



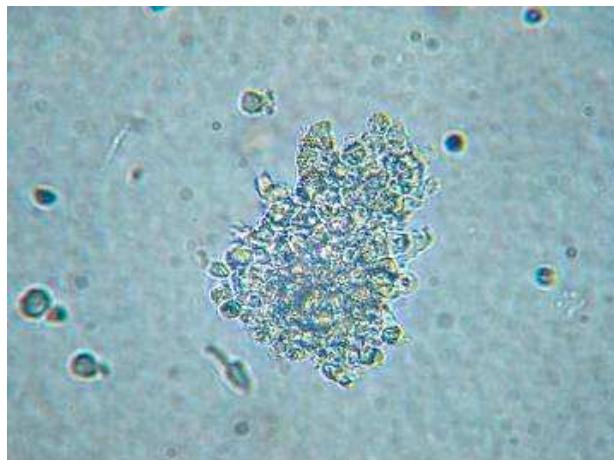
Slika 6: Mezenhimske matične celice izolirane iz popkovnične krvi (Lee in sod, 2004)

Zelo malo je bilo do zdaj napisanega o izolaciji, karakterizaciji in diferenciaciji MMC iz popkovnične krvi. Leta 2000 so Erices in sodelavci poročali o dveh adherentnih linijah iz popkovnične krvi in ena izmed njih je izražala površinske označevalce MMC (Erices in sod., 2000). Goodwin in sod. so leta 2001 poročali o multilinijski diferenciacijski sposobnosti celic izoliranih iz popkovnične krvi, ki izražajo kostne, maščobne in nevralne površinske markerje (Goodwin in sod., 2001). Kakinuma in sod. so leta 2003 poročali, da lahko diferencirajo celice iz popkovnične krvi v hepatocitne progenitorske celice (Kakinuma in sod., 2003). Vse zgoraj naštete raziskovalne skupine pa so do bile heterogene celice. Wexler in sod. so leta 2003 poročali, da popkovnična kri ni bogat vir MMC (Wexler in sod., 2003), medtem ko je Romanov predlagal uporabo endotelijskih celic iz popkovnične krvi kot vir MMC (Romanov in sod., 2003). Musina in sod. so leta 2007 poročali, da je v popkovnični krvi zelo malo MMC glede na začetni volumen v primerjavi s kostnim mozgom (Musina in sod., 2007; Kern in sod., 2006) in da imajo zelo nizko proliferativno zmožnost (Musina in sod., 2007). Kern in sod., pa so poročali ravno nasprotno in sicer, da jih lahko namnožijo v kulturi zaradi njihove visoke proliferativne zmožnosti (Kern in sod., 2006). Drug potencialni vir MMC pa naj bi bila tudi Whartonova žolica (Wang in sod., 2004).

2.1.4 Embrionalnim matičnim celicam podobne celice

Leta 2005 je McGuckin s sodelavci odkril nov tip matičnih celic v popkovnični krvi, ki so jih poimenovali embrionalnim matičnim celicam podobne celice – CBE (slika 7). Celice imajo lastnosti tako embrionalnih matičnih celic kot tudi krvotvornih celic. So pozitivne za embrionalne označevalce Oct-4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 in TRA-1-81 in so negativne za nehuman označevalec SSEA-1, ki izraža diferenciranost. Prav tako so pozitivne za krvotvorni površinski označevalec CD45. Od limfocitov, makrofagov in monocitov se fenotipsko ločijo po negativnih površinskih označevalcih CD3, CD20, CD11b/Mac-1 in CD14 ter od KMC po površinskem označevalcu CD34. Sposobne so se razmnoževati, diferencirati v več različnih tipov celic, so nizko imunogene ter imajo sposobnost uravnavanja imunskega sistema z inhibicijo mitogensko stimulirane proliferacije limfocitov B in T. Predstavljam velik potencial za zdravljenje Parkinsonove bolezni, diabetesa, poškodbe hrbtenjače, multiple skleroze, kardiovaskularnih bolezni, kapi

in za preprečevanje, zdravljenje ali zmanjšanje posledic avtoimunskih bolezni. Raziskave potekajo tudi na področju uporabe celic CBE kot celice podlage za rast embrionalnih matičnih celic. V kulturi se pritrdijo na podlago. *In vitro* jih lahko v nediferenciranem stanju ohranjamo več kot 13 tednov (Zhao in Mazzone, 2009; McGuckin in sod., 2005).



Slika 7: Embrionalnim matičnim celicam podobne celice iz popkovnične krvi (McGuckin in sod, 2006)

2.1.5 Celice VSEL

Celice VSEL (angl. Very Small Embryonic-like Stem Cells) ali populacijo zelo majnih matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi je prvi opisal Ratajczak in sod. v humani popkovnični krvi (Ratajczak in sod., 2007; Kucia in sod., 2007). Celice so velike od 2-4 µm, imajo veliko jedro z neorganiziranim kromatinom in ozek obod citoplazme. Izražajo transkripciojske faktorje kot so Oct-4, Nanog, SSEA-1 in Rex-1. Imajo tudi visoko telomerazno aktivnost in se v *in vitro* pogojih diferencirajo v celice vseh treh zarodnih plasti (Kucia in sod., 2007a; Kucia in sod., 2007b; Kucia in sod., 2006). Od vseh enojedrnic celic v KM jih celice VSEL predstavljajo le 0,01%. Izolirali so jih na podlagi izražanja površinskega antiga Sca-1 in odsotnosti površinskih označevalcev, značilnih za linijsko usmerjene celice (Lin), ter površinskega antiga CD45. Ne izražajo antigenov MHC-I in HLA-DR ter so negativne za površinske označevalce CD90, CD105 in CD29. Celice VSEL imajo vlogo pri ohranjanju homeostaze, ob poškodbi tkiva ali stresu pa se sprostijo v periferno kri in pomagajo pri obnovi poškodovanega tkiva oziroma organa. Mobilizacija teh celic ob nepravem času in njihovo zasidranje na neprava mesta, pa naj bi povzročila nastanek tumorjev (Ratajczak in sod., 2007; Kucia in sod., 2007a; Kucia in sod., 2007b; Kucia in sod., 2008).

2.2 MATIČNE CELICE V KOSTNEM MOZGU

Kostni mozek je mehko maščobno tkivo različne sestave, za katero je značilna rdeča ali rumena barva. Nahaja se v kostnih votlinah in sredici nekaterih kosti ter predstavlja kar 4% skupne telesne mase pri odraslem človeku. V rdečem kostnem mozgu nastajajo rdeče in bele krvne celice ter krvne ploščice. Pri otrocih je rdeči kostni mozek prisoten v gobastem tkivu v vseh kosteh, medtem ko ga pri odraslih v številnih kosteh zamenja rumeni kostni

mozeg. Pri odraslih ostane rdeči kostni mozeg aktiven pravzaprav samo še v kratkih in ploščatih kosteh, predvsem pa v prsnici, rebrih in medenici, drugod, zlasti v osrednjih votlinah dolgih kosti, pa ga zamenja rumeni. Rumeni kostni mozeg se razlikuje od rdečega po tem, da ima več maščobnih celic in da ne sodeluje pri tvorbi krvnih celic. Rumeni kostni mozeg se lahko v primeru povečanih potreb, na primer pri obilnih krvavitvah, pretvori zopet v rdečega in s tem se poveča krvotvorna zmožnost organizma. Prepreko, ki onemogoča, da bi nezrele krvne celice zapuščale kostni mozeg ter zašle v krvni obtok, predstavljajo krvne žile. Le zrele celice, ki vsebujejo ustrezne membranske beljakovine, se lahko pričvrstijo na žilni endotelij ter ga prehajajo. To pregrado lahko prehajajo sicer tudi matične celice, zato jih lahko pridobijo tudi iz krvi in ne le neposredno iz kostnega mozga (Pretnar in sod., 2005).

Poleg KMC in MMC, opisanih v poglavju 2.1, z naslovom Matične celice v popkovnični krvi, se v kostnem mozgu nahajajo še hemangioblasti (Peichev in sod., 2000; Xiong, 2008), multipotentne prednice odraslega (Jiang in sod., 2002), celice MIAMI (D'Ippolito in sod., 2004), in hMSC (Beltrami in sod., 2007).

2.2.1 Hemangioblast

Hemangioblast je multipotentna matična celica iz katere lahko nastanjejo KMC in endotelne prednice-angioblasti (Xiong, 2008; Orkin in Zon, 2008), ki se nato v procesu vaskulogeneze v embriju na novo diferencirajo v endotel ali pa se v procesu angiogeneze razvijejo v žile in kapilare. Hemangioblasti se razvijejo iz embrionalne matične celice (Bailey in sod., 2004; Jin in sod., 2009), obstajali pa naj bi tudi v odraslem človeku (Schatteman, 2004; Loges in sod., 2004; Reyes in sod., 2002), čeprav avtorji o tem nimajo enotnega mnenja. Hemangiobaste se ne da morfološko identificirati, izražajo pa enake specifične površinske označevalce kot KMC in sicer CD133 in CD34 ter transkripcijska faktorja GATA-1 in GATA-2, ki sodlujeta pri hematopoezi. (Xiong, 2008). Od KMC pa jih loči prisotnost receptorja 2 za rastni faktor žilnega endotela (flk-1/ VEGF-R2/KDR (Piechev in sod., 2000; Xion, 2008).

2.2.2 Multipotentne prednice odraslega

Multipotentne prednice odraslega ali MAPC (angl. Multipotent Adult Progenitor Cells) so pluripotentne adherentne matične celice iz kostnega mozga, ki imajo določene lastnosti embrionalnih matičnih celic (Jiang in sod., 2002; Sohni in Verfaillie, 2011). Iz humanega kostnega mozga so jih prvič izolirali leta 2001 v laboratoriju Catharine Verfaillie. MAPC so ontogenetsko celo bolj primitivne celice kot hemangioblasti, zato so primeren vir endoteljskih celic v regenerativni medicini in so uporabne kot model za karakterizacijo endotelnih prednic in njihovega razvoja do zrele oblike (Reyes in sod., 2002). Celice MAPC šibko izražajo naslednje celične označevalce CD90 (Thy-1), CD133, β 2-mikroglobulin, VEGFR2 (Flk-1), močneje pa izražajo CD13 in CD49b. Za MAPC je značilna telomerazna aktivnost in izražanje pluripotentnih označevalcev kot so Oct-4, SSEA-1, Nanog in Rex1. *In vitro* se lahko diferencirajo v celice značilne za vse tri zarodne plasti (Jiang in sod., 2002; Sohni in Verfaillie, 2011). MAPC so bile edine domnevno

pluripotentne matične celice iz odraslih tkiv, za katere je bilo dokazano, da ob vnosu v blastocisto prispevajo k razvoju večine celic (Schwartz in sod., 2002).

2.2.3 Celice MIAMI

Celice MIAMI (angl. marrow isolated adult multilineage inducible cells) so prvič izolirali leta 2004 iz humanega kostnega mozga. So pluripotentne celice, ki se med gojenjem pritrдиjo na podlago. Veliče so od 7-10 µm, imajo malo citoplazme in se hitro delijo. Izražajo naslednje označevalce: CD29, CD63, CD81, CD90, CD122, CD164, c-met, BMPR1B, (Bone morphogenetic protein receptor B1), NTRK3 (Neurotrophic tyrosine kinase receptor 3) in so negativne za CD36, CD34, CD45, CD117 in HLA-DR označevalce. Poleg zgoraj naštetih označevalcev in telomeraze izražajo tudi transkripcijska faktorja Oct-4 in Rex1, ki sta značilna za pluripotentne matične celice. Pri diferenciaciji in vitro so sposobne tvoriti celice iz vseh treh zarodnih plasti (D'Ippolito in sod., 2004).

2.2.4 Celice hMASC

Celice hMASC (angl. human multipotent adult stem cells) so izolirali iz kostnega mozga, jeter, srca (Beltrami in sod., 2007), lasnega folikla (Yu in sod., 2006) in iz povrhnjice (Balaji in sod., 2010). Izražajo transkripcijske faktorje Oct-4, Nanog in Rex1, ki so značilni za pluripotentne matične celice. Kažejo pa tudi telomerazno aktivnost in so sposobne diferenciacije v celice iz vseh treh zarodnih plasti. Celice so pozitivne za naslednje celične označevalce: CD13, CD90, CD73, CD44, CD29, CD105, MHC I in negativne za HLA-DR, CD14, CD34, CD45, CD38, CD133 in CD117 označevalce (Beltrami in sod., 2007).

2.3 ZDRAVLJENJE Z MATIČNIMI CELICAMI

KMC, matične celice iz popkovnične krvi in nekatere matične celice iz odraslih tkiv že uporabljajo pri zdravljenju različnih bolezni (Pregl. 3, pregl. 4, pregl. 5). Temeljni princip delovanja matičnih celic je v njihovi sposobnosti, da kot zdrave celice nadomestijo bolne oziroma spremenjene celice. Pri tem ločimo dve možnosti: prva možnost je, da se bolne celice predhodno uniči (npr. s kemoterapijo), nato pa s transplantacijo zdravih celic nadomesti odstranjene bolne celice in pa druga možnost, da zdrave matične celice neposredno same uničijo bolne celice in jih nadomestijo v njihovem delovanju (Minn in Najem., 2011).

Poznamo dve vrsti zdravljenja s človeškimi matičnimi celicami: avtologno in alogensko. Pri avtologni presaditvi bolniku presadijo njegove lastne matične celice. Pri alogenski sorodni presaditvi pa prejme pacient matične celice od sorodne tkivno skladne osebe. Najprimernejši dajalec je bolnikov brat ali sestra, redkeje starši, otroci, bratranec ali sestrična, ki se z njim ujema v podedovanih lastnostih, imenovanih antigeni HLA. Žal je taka skladnost možna le v 25% primerov. Zadnje čase se vse bolj uveljavlja alogenska nesorodna presaditev matičnih celic. Če bolnik nima sorodnega HLA tkivno skladnega dajalca, ali zaradi narave bolezni avtologna presaditev ni možna, se odločijo za presaditev nesorodnega tkivno skladnega dajalca, ki se poišče v mednarodnih registrih prostovoljnih dajalcev kostnega mozga v katerega je vključen slovenski nacionalni register dajalcev

KMC (SD, Slovenija-Donor). Zaradi možnosti zapletov in neželenih učinkov zdravljenja se izvaja pri bolnikih, ki so mlajši od 45 let, in le pri tistih boleznih, kjer nobeno drugo zdravljenje ne omogoča ozdravitve ali bistvenega izboljšanja bolezni (kronična mieloična levkemija, mielodisplastični sindrom) (Pretnar, 2007; Kondo in sod., 2003).

Uporaba lastnih celic za zdravljenje ima veliko prednost pred uporabo tujih celic, saj pri njihovi presaditvi ne pride do zavrnitvene reakcije. Trenutno je uporaba matičnih celic omejena na enostavne konstrukte, večinoma v obliki suspenzije. Ustvarjanje kompleksnih organov kot so na primer ledvice ali jetra je zaenkrat še neizvedljivo v kliniki.

Preglednica 3: Seznam nekaterih bolezni, ki jih zdravijo z matičnimi celicami in jih je odobrila FDA-Food and Drug Administration (Smith in sod., 2006).

Akutna limfoblastna levkemija (Ohuma in sod., 2001; Marco in sod., 2000)
Kronična mieloična levkemija (Ohuma in sod., 2001; Marco in sod., 2000)
Juvenilna mielomonocitna levkemija (Ohuma in sod., 2001; Marco in sod., 2000)
Mielodisplazija (Ohuma in sod., 2001; Besinger in sod., 2001)
Akutna mieloična levkemija (Gorin in sod., 2000; Bruserud in sod., 2000)
Multipli mielom (Laughlin in sod., 2001; Vesole in sod., 1999)
SCID X1 (Cavazzana-Calvo in sod., 2000)
Anemija srpastih celic (Gürman in sod., 2001; Kook in sod., 2000)
Talasemija (Tan in sod., 2004)

Preglednica 4: Terapije z matičnimi celicami, ki so v fazi kliničnih raziskav (Clinical Trials.gov).

Nadaljevanje.	
Avtoimunske bolezni	Genska terapija (presaditev pacientovih gensko spremenjenih avtolognih MC)
Kronova bolezen	Glanzmann-ova trombostenija
Diabetes tipa 1	SCID
Lupus	SCID ob pomanjkanju adenosid deaminaze
Bolezni živčnega sistema	SCID vezana na X kromosom
Cerebralna paraliza, hipoksija, encefalopatija	Beta talasemija
Multipla skleroza	Wiskott-Aldrich-ov sindrom
Travmatične poškodbe možganov	Ewingov sarkom
Poškodbe hrbtnače	Retinoblastom
Proliferativne in metabolne motnje	Bolezni srca
Cistična fibroza	Miokardni infarkt
Familiarna eritrofagocitna limfohistiocitoza	Angina
Hemofagocitoza	Kardiomiopatijs
Histocitoza Langerhansovih celic	Obnovitev poškodovanega organa
Bulozna epidermolza	obnovitev roženice
	degeneracija rumene pege

Se nadaljuje.

SCID-huda kombinirana imunska pomanjkljivost

Preglednica 5: Eksperimentalno zdravljenje z matičnimi celicami, ki poteka na živalih ali celičnih kulturah (Diseases treated by blood stem cells, 2011).

Nadaljevanje.

Transplantacija matičnih celic	Genska terapija
HIV, AIDS	Fanconijeva anemija
Avtoimunske bolezni	Parkinsonova bolezen
Juvenilni idiopatski artritis	Bolezni živčnega sistema
Revmatoидni artritis	Duchenne mišična distrofija
Evansov sindrom	Amiotrofična lateralna skleroza
Juvenilni dermatomiozitis	Alzhajmerjeva bolezen
Skleroderma	Huntingtonova bolezen
Obnovitev poškodovanega organa	Parkinsonova bolezen
Kombinirana transplantacija ledvic in KMC	Izguba sluha
Diferenciacija renalnih celic iz odraslih MC	Poškodba hrbtenjače
Diferenciacija dihalnega epitelija iz MC kostnega mozga	Travmatska poškodba možganov

Se nadaljuje.

HIV-virus humane imunske pomanjkljivosti; AIDS-sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti

2.3.1 Zgodovina presajanja KMC v svetu

2.3.1.1 Presajanje kostnega mozga

Raziskovanje KMC se je začelo po atomskem napadu na Hiroshima in Nagasaki leta 1945. Radioaktivno sevanje je imelo toksično delovanje na krvotvorni sistem, ki ni bilo več sposobno obnavljati učinkovitih belih krvničk, ki bi obvarovali telo proti ne-patogenim infekcijam ter proizvajati zadostno število trombocitov, ki bi strjevali kri. Posledica takšnega sevanja je bila smrt (Domen in sod., 2006).

Leta 1951 so Lorenz in sod. ugotovili, da lahko z infuzijo kostnega mozga zdrave živali obnovijo krvotvorni sistem obsevane poskusne živali (Lorenz in sod., 1951). Poskusi na miših so tudi pokazali, da se lahko imunske celice iz presajenega alogenskega kostnega mozga odzovejo na antigene gostitelja, napadejo njegove organe in tkiva ter povzročijo bolezen presadka proti gostitelju (GVHD). Pri poskusu presaditve kostnega mozga levkemičnim mišim, obsevanim z nemieloablativnim odmerkom sevanja, sta Barnes in Loutit leta 1954 ugotovila, da se lahko presajane imunske celice odzovejo na maligne celice prejemnika (Ford in sod., 1956). Učinek so poimenovali učinek presadka proti levkemiji (GVL – graft versus leukaemia effect). Pomen nastanka GVHD ali GVL po alogenski presaditvi kostnega mozga so spoznali šele v 70. letih, ko so dosegli trajnejše delovanje presadka. Raziskave na živalih so spodbudile Edwarda Donnalla Thomasa, da je s sodelavci leta 1959 prvič bolniku z akutno levkemijo presadil alogenski kostni mozeg njegovega brata dvojčka. Slednji in tudi večina drugih poskusov presajanja kostnega mozga v tem obdobju so bili neuspešni (Domanović, 2007). Leta 1960 sta Till in McCulloch ugotovila, katere celice v kostnem mozgu so sposobne obnavljati krvotvorni sistem, to so bile KMC (Till in McCullough, 1961).

Konec 50. in v začetku 60. let prejšnjega stoletja so odkrili antigene HLA in njihov pomen pri presajanju tkiv in organov. Leta 1954 sta Miescher in Fauconnet v človeški krvi odkrila protilevkocitna protitelesa, ki so nastala po transfuziji krvi ali v nosečnosti. Z uporabo teh protiteles sta Dausset in van Rood določala antigene na levkocitih, ki so jih kasneje poimenovali antigeni HLA. Sredi 60. let so s poskusi na psih dokazali, da je alogenska presaditev kostnega mozga uspešna, če imata prejemnik in darovalec enake antigene DLA (dog leukocyte antigens) na levkocitih. Hkrati so potrdili, da skladnost med prejemnikom in darovalcem v antigenih HLA odločilno vpliva na uspešno presaditev organov in tkiv tudi pri človeku. Poznavanje pomena antigenov HLA, učinkovitejši antibiotiki in citostatiki so omogočili, da je Gatti s sodelavci leta 1968 izvedel prvo uspešno sorodno alogensko presaditev kostnega mozga bolniku s hudo kombinirano imunske pomanjkljivostjo. V 70. letih prejšnjega stoletja, ko so se alogenske presaditve kostnega mozga že uveljavile v praksi, so pričeli bolnikom presajati tudi njihov lastni kostni možeg (Domanović, 2007; Rubinstein, 2006).

2.3.1.2 Presajanje KMC iz periferne krvi

Leta 1900 je ruski biolog Aleksander Maximow trdil, da se med malimi limfociti v periferni krvi nahaja majhno število celic, ki imajo ali lahko pridobijo lastnosti pluripotentnih matičnih celic. Prisotnost KMC v krvi so dokazali šele v 60. letih prejšnjega stoletja in ugotovili, da jih lahko presajamo enako uspešno kot KMC iz kostnega mozga. Majhno število KMC v krvi je bila ovira za njihovo učinkovito zbiranje in uporabo. S celičnimi ločevalci so leta 1977 pokazali, da je možno z več zaporednimi citafereznimi postopki zbrati iz venske krvi veliko število KMC. Prve uspehe so dosegli z zbiranjem, zamrzovanjem in presajanjem bolnikovih lastnih KMC iz venske krvi po zdravljenju kronične mieloične levkemije z velikimi odmerki citostatikov. S tem so začrtali temelje razvoja avtolognega presajanja KMC iz venske krvi. Vendar je bilo za zbiranje zadostnega števila KMC za presajanje potrebno opraviti 6–8 levkocitaferez, kar je bilo nesprejemljivo za vsakdanjo prakso. Izkušnje iz leta 1976 so pokazale, da se 2–3 tedne po mielosupresivnem zdravljenju značilno poveča število KMC v krvi. Da bi zvečali število KMC v krvi bolnikov na raven, pri kateri bi bilo njihovo zbiranje smotrno in učinkovito, so dajali bolnikom citostatike (Domanović, 2007).

Leta 1980 so prvič poročali o sorodni singenski presaditvi KMC iz periferne venske krvi pri bolniku z Ewingovim sarkomom. Od leta 1984 so pospešeno raziskovali zbiranje, kriokonzervacijo in presajanje avtolognih KMC iz krvi pri bolnikih z rakavimi obolenji krvotvornega tkiva. Po odkritju rastnih dejavnikov, ki so se uporabljali za mobilizacijo KMC iz kostnega mozga v kri, se je uporaba KMC iz venske krvi uveljavila v klinični praksi, tako za avtologne kot tudi za alogenske presaditve. Danes se KMC iz venske krvi uporablja pri skoraj vseh avtolognih presaditvah odraslih in pri več kot 60 % alogenskih presaditev. Prednosti presajanja KMC iz venske krvi v primerjavi s presajanjem kostnega mozga je več. Primerjave kliničnih raziskav so pokazale, da je po presaditvi KMC iz venske krvi začel presadek delovati hitreje, vzpostavitev imunskega sistema je bila boljša, obolenost povezana s presajanjem je bila manjša in preživetje bolnikov večje. Pogostnost nastanka GVHD je bila enaka kot pri presajanju kostnega mozga. Zaradi zgodnejšega začetka tvorbe levkocitov in trombocitov po presaditvi KMC iz venske krvi je obseg nadomestnega zdravljenja s pripravki trombocitov in eritrocitov manjši. Hkrati je odvzem

KMC iz periferne krvi manj invaziven poseg od odvzema kostnega mozga in s tem tudi ugodnejši za darovalca in bolnika (Domanović, 2007).

2.3.1.3 Presajanje KMC iz popkovnične krvi

Leta 1972 so v ZDA prvič poročali o poskusu zdravljenja otroka z akutno limfoblastno levkemijo z večkratnimi zaporednimi infuzijami PK. Leta 1988 so v Parizu otroku s Fanconijevim anemijo uspešno presadili sorodno PK (Gluckman in sod., 1989). Manjša pogostost GVHD pri alogenskih presaditvah sorodne PK je spodbudila nastanek hipoteze, da je možno presaditi tudi nesorodno alogenico PK. V ta namen so leta 1991 v transfuzijskem centru v New Yorku ustanovili prvo banko za shranjevanje alogenske nesorodne PK (Gluckman, 2009) . PK iz omenjene banke so prvič presadili 1993 otroku z akutno limfoblastno levkemijo (Kurtzberg in sod., 1996). Leta 1996 so odraslemu s mielogeno levkemijo prvič uspešno presadili nesorodno PK (Laporte in sod., 1996). Do danes so opravili več kot 20.000 presaditev nesorodnih KMC iz PK in na voljo je več kot 400.000 enot PK za transplantacije shranjenih v 100 bankah (Gluckman, 2009; BMDW, 2009).

2.3.2 Zgodovina presajanja KMC v Sloveniji

2.3.2.1 Presajanje kostnega mozga

V Sloveniji so v zgodnjih 60. letih prejšnjega stoletja v Mariboru opravili prvo presaditev kostnega mozga, kasneje pa tudi na Jesenicah in v Brežicah. Leta 1962 je Černelč s sodelavci prvič poročal o nesorodni alogenici presaditvi kostnega mozga, ki so jo opravili v mariborski bolnišnici pri bolniku z akutno levkemijo. Žal so bili začetni poskusi presajanja kostnega mozga neuspešni zaradi nerešljivih zapletov, predvsem reakcije presadka proti gostitelju, kar je začasno ustavilo nadaljevanje takšnega načina zdravljenja. Presaditve KMC so se v slovenski hematološki klinični praksi pričele rutinsko izvajati leta 1989 v Ljubljani. Skupina za presajanje KMC, ki je bila sestavljena iz strokovnjakov Kliničnega oddelka za hematologijo Kliničnega centra v Ljubljani, Zavoda Republike Slovenije za transfuzijo krvi v Ljubljani in Onkološkega inštituta v Ljubljani, je konec decembra 1988 in v začetku januarja 1989 odvzela in shranila avtologni kostni mozeg 19-letnega moškega bolnika z akutno limfoblastno levkemijo. Deset dni kasneje, po pripravi z busulfanom in ciklofosfamidom, so bolniku lastni kostni mozeg presadili. Tri mesece kasneje so pri bolniku s kronično mieloično levkemijo opravili tudi sorodno alogenico presaditev kostnega mozga. Najprej so presajanje KMC iz kostnega mozga izvajali le pri odraslih bolnikih z malignimi boleznimi krvnega tkiva. Leta 1991 pa so v program zdravljenja bolezni s presajanjem kostnega mozga vključili tudi otroke in izvedli prvo avtologno presaditev kostnega mozga pri otroku z nevroblastomom na Pediatrični kliniki v Ljubljani. Istega leta je bil ustanovljen Register darovalcev kostnega mozga - Slovenija Donor (Pretnar, 2004; Domanović, 2007).

2.3.2.2 Presajanje KMC iz periferne krvi

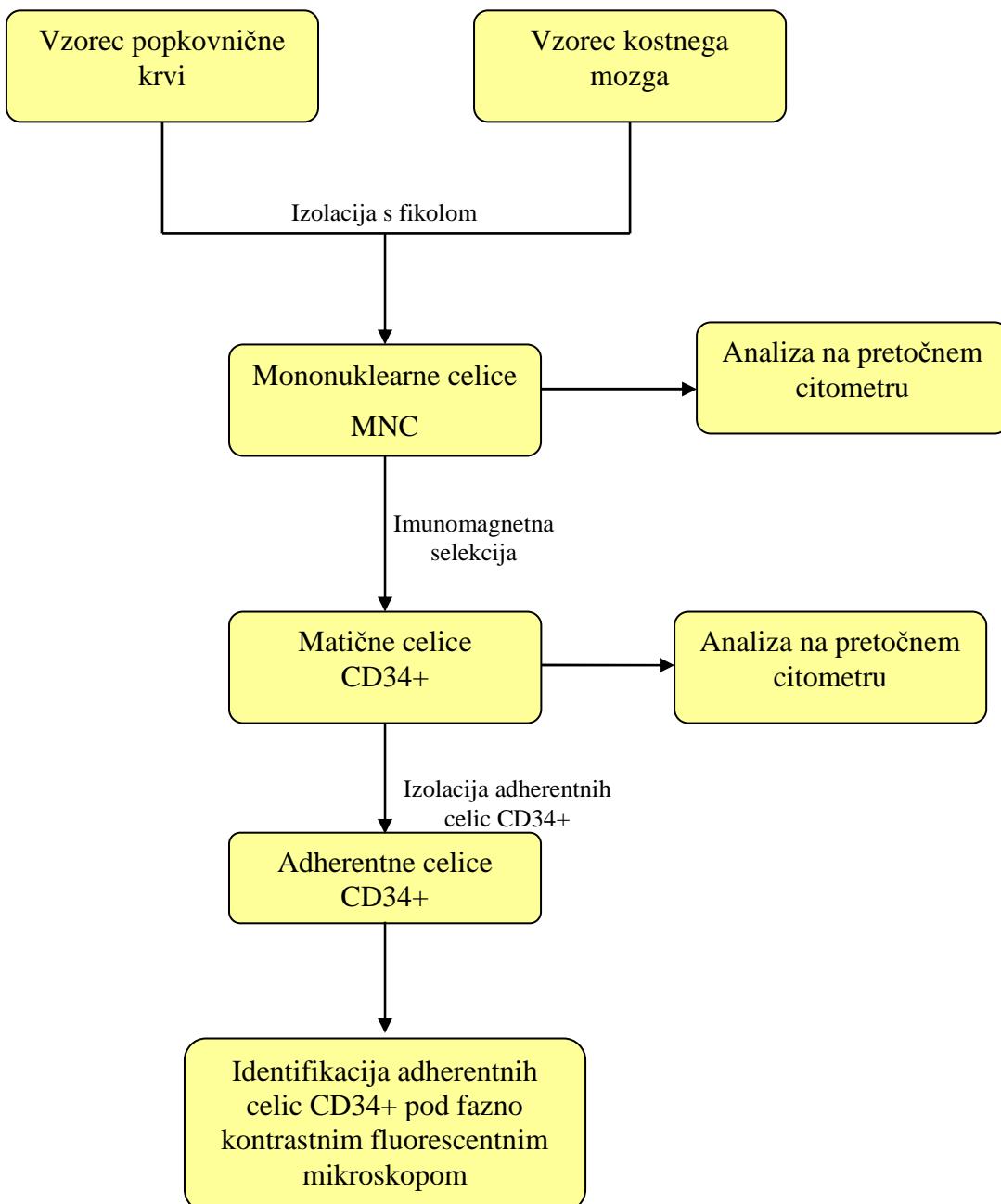
Prvi odvzem KMC iz periferne venske krvi za alogensko presaditev so izvedli na Zavodu RS za transfuzijo krvi v Ljubljani leta 1994. Istega leta so tudi prvič odvzeli KMC iz periferne venske krvi za avtologno presaditev bolniku z akutno mieloblastno levkemijo. Citokine, ki spodbujajo tvorbo granulocitnih kolonij (G-CSF, angl. granulocyte colony-stimulating factor), so prvič dali darovalki KMC za sorodno alogensko presaditev leta 1995 zaradi štirikratnega neuspešnega zbiranja KMC s celičnim ločevalcem. Leta 1997 so opravili prvo avtologno presaditev KMC pri bolnicah s karcinomom dojke in leta 2000 tudi z malignimi limfomi (Pretnar, 2004; Domanović, 2007).

2.3.2.3 Presajanje KMC iz popkovnične krvi

Prvo zbiranje KMC iz popkovnične krvi za sorodno alogensko presaditev so leta 1999 izvedli na Zavodu RS za transfuzijsko medicino in v Porodnišnici Ljubljana. Leta 2004 pa so izvedli tudi alogensko nesorodno presaditev PK na Pediatrični kliniki v Ljubljani. PK so pridobili iz banke popkovnične krvi v otroški bolnišnici v Sydneyu v Avstraliji (Pretnar, 2004; Domanović, 2007).

3 METODE IN MATERIALI

3.1 POTEK DELA



Slika 8: Shema poteka dela

3.2 METODE

3.2.1 Pridobivanje vzorcev popkovnične krvi in kostnega mozga

Odvzem PK opravi babica v porodnišnici po porodu otroka, ko se popkovnica prereže in preneha utripati. Iglo zabodejo v veno popkovnice, ko je posteljica še v maternici. Kri steče po cevki v sterilno vrečko za zbiranje popkovnične krvi, ki vsebuje 21 mL sredstva proti strjevanju krvi CPD (angl. Citrate Phosphate Dextrose Solution). Kri se nato dostavi v banko za shranjevanje popkovnične krvi v roku 48 ur in se jo obdela, zamrzne ter shrani v tekočem dušiku (Darovanje popkovnične ... , 2010). Vzorce krvi smo dobili iz javne banke ESPOK na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, ki niso ustrezaли standardom za shranjevanje. V diplomski nalogi smo uporabili vzorce, ki so vsebovali manj kot 9×10^8 levkocitov in tako niso izponjevali pogojev za nadaljno obdelavo in dolgotrajno shranjevanje v tekočem dušiku ter več kot 7×10^8 levkocitov.

S podpisom privolitve (Priloga A) so prostovoljci darovalci popkovnilne krvi soglašali, da se lahko njihovi vzorci ob neizpopolnjevanju pogojev za shranjevanje uporabijo v raziskovalne namene. Za delo z vzorci smo pridobili soglasje Komisije za medicinsko etiko RS številka 164/02/09.

Vzorec kostnega mozga odvzamejo na klasičen način v lokalni anesteziji s posebno sterilno iglo in brizgo iz ploščate medenične kosti. Zbrani kostni možeg je po videzu podoben krvi, le da je bolj gost. Vzorce kostnega mozga smo dobili od prostovoljcev brez krvnih bolezni, ki so v diagnostičnem postopku na Kliničnem oddelku za hematologijo Kliničnega centra v Ljubljani. Postopek punkcije je opravil odgovorni zdravnik Kliničnega oddelka za hematologijo Kliničnega centra v Ljubljani.

S podpisom privolitve (Priloga B) so prostovoljci darovalci kostnega mozga soglašali, da se lahko njihovi vzorci uporabijo v raziskovalne namene. Za delo z omenjenimi vzorci smo dne 23.07.2002 pridobili soglasje Komisije za medicinsko etiko RS številka 105/07/02.

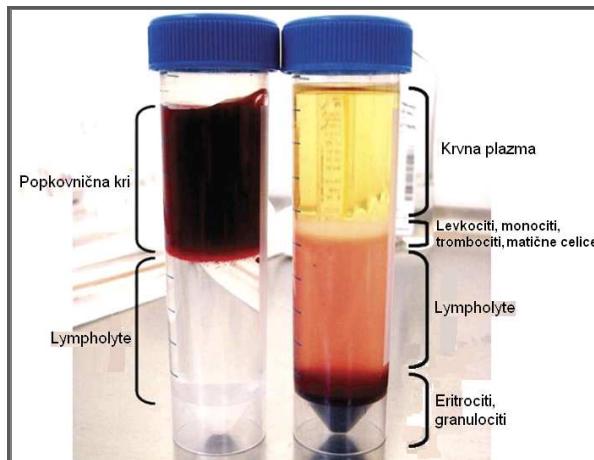
3.2.2 Izolacija mononuklearnih celic

Mononuklearne celice (MNC, angl. mononuclear cell) smo iz popkovnične krvi izolirali z raztopino Lympholyte®-H, ki temelji na ločevanju krvnih celic v gostotnem gradientu po izpostavitvi centrifugalni sili. Lympholyte®-H je sintetični polimer saharoze in natrijevega diatrizoata z gostoto 1,077 g/mL. Med centrifugiranjem celice potujejo glede na svojo gostoto različno daleč vzdolž vertikalne osi raztopine. Eritrociti agregirajo, zato se jim poveča hitrost sedimentacije in se po centrifugiranju nahajajo v peletu na dnu centrifugirke, prav tako tudi granulociti. Limfociti, monociti in trombociti nimajo dovolj velike gostote, da bi penetrirali v plast fikola, zato se po ločevanju nahajajo na meji med plazmo ter fikolom in so vidni kot bel obroček (slika 9). S spiranjem MNC se znebimo trombocitov, preostanka plazme in gradientnega medija (Cedarslane, 2010).

Vzorec popkovnične krvi smo najprej redčili v razmerju 1:1 s pufrom D-PBS brez Ca^{2+} in Mg^{2+} ionov. Razmerje med Lympholyte®-H in krvjo mora biti vedno 1:2, zato smo v 50

mL centrifugurke nanesli 12,5 mL na sobno temperaturo segretega Lympholyte®-H, nanj pa 25 mL razredčene popkovnične krvi. Pri tem smo morali paziti, da se fazi med seboj nista pomešali. Vzorce smo nato centrifugirali na sobni temperaturi 30 minut s hitrostjo $400 \times g$ brez pospeševanja in zaviranja. Med centrifugiranjem so se različni tipi krvnih celic razporedili glede na svojo gostoto v ločene plasti. Nato smo s Pasteurjevo pipeto pobrali plast MNC in jih prenesli v novo centrifugirko ter dodali pufer D-PBS do končnega volumna 50 mL in centrifugirali na sobni temperaturi 10 minut s hitrostjo $300 \times g$. Po centrifugiraju smo odstranili supernatant in pelet resuspendirali v 50 mL pufra D-PBS ter centrifugirali na sobni temperaturi 10 minut pri $200 \times g$, da smo se znebili trombocitov. Za nadaljnje delo z MNC smo odstranili supernatant in celice resuspendirali v 400 μl pufra za spiranje.

Za izolacijo mononuklearnih celic iz kostnega mozga uporabimo enak postopek, le da uporabimo 15 mL centrifugirke v katero nanesemo 3 mL na sobno temperaturo segretega Lympholyte®-H, nanj pa 6 mL razredčenega kostnega mozga.



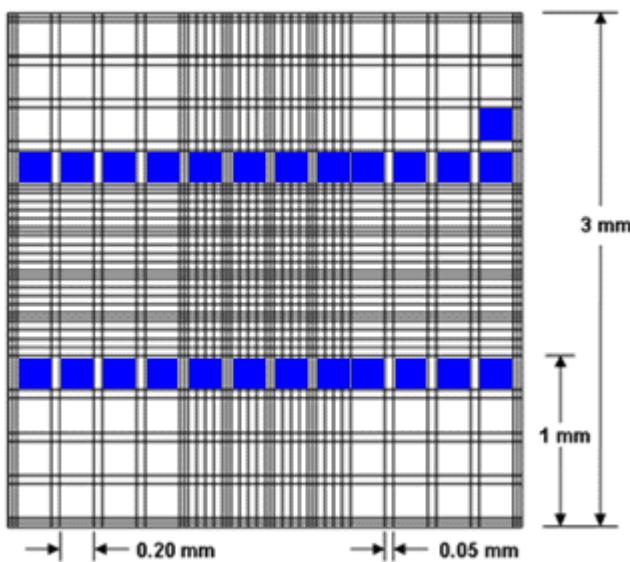
Slika 9: Izolacija mononuklearnih celic z raztopino Lympholyte®-H. Levo je prikazana plast popkovnične krvi nad sredstvom Lympholyte®-H pred centrifugiranjem in desno ločene plasti celic po centrifugirjanju (McGuckin in sod, 2008).

3.2.3 Določanje števila izoliranih celic

Celice smo prešteli pod svetlobnim mikroskopom z uporabo Bürker-Türkovega hemocitometra. Na Bürker-Türkovi števni ploščici je vgravirana mreža, sestavljena iz 9 velikih kvadratov. Površina vsakega izmed njih je 1 mm^2 . Veliki kvadrati so razdeljeni na 16 manjših, katerih stranice so dolge 0,2 mm, torej je njihova površina $0,04 \text{ mm}^2$. V sredini števne ploščice je vsak takšen kvadrat s stranico 0,2 mm razdeljen še na 16 manjših kvadratkov s stranico 0,05 mm in površino $0,0025 \text{ mm}^2$ (Slika 10). Globina špranje med dnom števne komore in krovnim stekelcem je 0,1 mm. V epico smo dodali 180 μl tripanskega modrila in 20 μl celične suspenzije (1:10) in dobro premešali s pipeto. Krovno stekelce smo položili na Bürker-Türkovi hemocitometer in s pomočjo pipete iztisnili 20 μl mešanice vzorca pod krovno stekelce in ga nato vstavili v mizico svetlobnega mikroskopa. Mikroskop izostrimo na 100x povečavi in preštejemo žive celice v 25 kvadratkih števne mreže; izberemo 12+1 kvadrat tik nad osrednjim delom mreže ter 12 kvadratkov tik pod

osrednjim delom mreže (slika 10). Žive celice ne sprejmejo barvila in po barvanju ostanejo bele, medtem ko se mrtve celice obarvajo modro. Celice, ki ležijo na spodnji in desni stranici vsakega od kvadratkov ne štejemo. Koncentracijo celic smo izrazili v številu celic na mL.

Volumen komore: prostornina 25 kvadratkov števne mreže je $0.04 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm}$ (globina števne komore) $\times 25 = 0.1 \text{ mm}^3 = 0.1 \mu\text{l} = 10^4 \text{ mL}$



Slika 10: Mreža Bürker-Türkove ploščice s podatki o velikosti komor (Cell counting slides, 2010)

Število živih mononuklearnih celic smo izračunali po formuli:

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

N – število izoliranih MNC v $10^6/\text{mL}$

n – število preštetih MNC v 25 kvadratkih števne komore

R – faktor redčenja celične suspenzije s tripanskim modrilom.

V – volumen celične suspenzije v mL

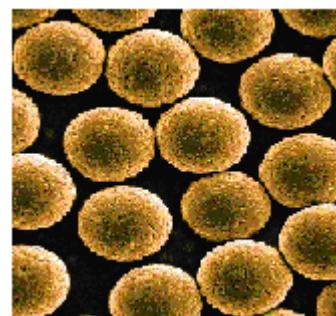
3.2.4 Izolacija celic CD34+ iz vzorca MNC z Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System

Za imunomagnetno ločevanje celic smo uporabili komercialni kit Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System, ki je namenjen izolaciji celic CD34+ iz MNC, pridobljenih iz vzorcev kostnega mozga, popkovnične ali periferne krvi. Postopek imunomagnetnega ločevanja celic temelji na označevanju celic s protitelesi, specifičnimi za določen antigen (slika 13). Na protitelesa so neposredno ali posredno vezani magnetni delci s pomočjo katerih ločimo želene celice v zunanjem magnetnem polju. V primeru kompleta Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System imajo magnetni delci, tako imenovani Dynabeads®, premer 4,5 μm (slika 12) ter so prekriti s primarnimi

monoklonskimi protitelesi specifičnim za membranski antigen CD34, ki ga izražajo KMC in enodelijske progenitorske celice. Ločevanje poteka v centrifugirki, ki jo postavimo v magnetno stojalo (slika 11). Po določenem času s pasterko odstranimo pufer za spiranje v katerem so ostale neoznačene celice, označene celice pa so se pritrstile na rob centrifugirke. Da dobimo čisto populacijo celic jih večkrat speremo s puferom za spiranje. Nato vzamemo centrifugirko iz magnetnega polja in dodamo enak volumen DETACHaBEAD kot smo na začetku dodali magnetnih delcev. DETACHaBEAD so poliklonska anti-Fab protitelesa specifična za primarno protitelo CD34. Na koncu dobimo celice CD34+ brez vezanih protiteles in magnetnih delcev. Izolirane celice resuspendiramo v gojitvenem mediju. (Invitrogen, 2007).



**Slika 11: Magnetno stojalo
(Invitrogen, 2010)**



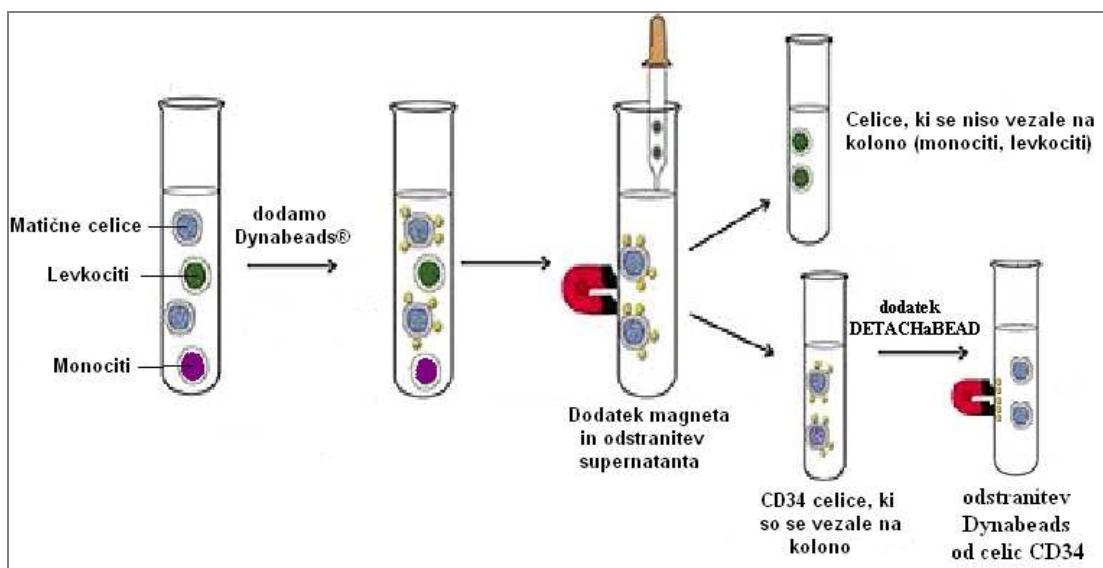
**Slika 12: Magnetni deleci – Dynabeads
(Netterwald, 2008)**

Pred začetkom smo si pripravili pufer za spiranje (0,1% BSA v pufru D-PBS) in ga ohladili na 4°C. S celicami smo delali hitro, jih ohranjali hladne, da smo zmanjšali fagocitotsko aktivnost in druge metabolne procese ter uporabljali predhodno ohlavljene reagente, s čimer smo preprečili nespecifično vezavo protiteles na celice. Nadaljnji protokol je napisan za izolacijo 4×10^7 do 1×10^8 celic. Za 4×10^7 celic potrebujemo 100 µl Dynabeads® CD34. Količino uporabljenih reagentov smo sorazmerno prilagodili dejanskemu številu celic.

V vzorcu MNC smo najprej določili koncentracijo celic s pomočjo hemocitometra kot je opisano v točki 3.2.3. 100 µl Dynabeads®-ov smo pred uporabo sprali v centrifugirki z enako količino ali z najmanj 1 mL pufra za spiranje. Centrifugirko z Dynabeads® smo vstavili v magnetno kolono, kjer so se Dynabeads® prijeli ob rob centrifugirke, pufer za spiranje pa smo odstranili s pomočjo pasterke. Nato smo centrifugirko vzeli iz magneta ter resuspendirali Dynabeads® v enakem volumnu kot na začetku (100 µl). Vzorcu MNC smo dodali sprane Dynabeads®, dobro premešali s pipeto in jo inkubirali 30 min pri 4°C in jo vmes večkrat premešali. Po inkubaciji smo v centrifugirko dodali hladen pufer za spiranje do koder so segali na celice vezani Dynabeads® oz. najmanj 1 mL in dobro premešali. Centrifugirko smo nato vstavili v magnetno stojalo za 2 min, pri čemer so se celice z vezanimi Dynabeads® prijele na rob centrifugirke, ostale celice v suspenziji pa smo odpipetirali in zavrgli. Centrifugirko smo nato odstranili iz magnetnega stojala in celice z vezanimi Dynabeads® resuspendirali v 2 mL pufra za spiranje ter jih postavili nazaj na magnetno stojalo za 1 min. Celotni postopek spiranja smo ponovili še enkrat in na koncu celice z vezanimi Dynabeads® resuspendirali v 100 µl pufer za spiranje. K suspenziji smo dodali enak volumen DETACHaBEAD kot smo na začetku uporabili Dynabeads®-ov. Suspenzijo smo inkubirali 45 min na sobni temperaturi. Vmes smo celice večkrat

premešali. Po končani inkubaciji smo celicam dodali 2 mL pufra za spiranje, jih vorteksirali pri nizki hitrosti za 2-3 s, da smo pospešili ločevanje celic od Dynabeads® ter centrifugirko ponovno postavili v magnetno stojalo za 2 min. Supernatant, v katerem so sedaj celice CD34+ smo prenesli v svežo centrifugirko. Da bi dobili čim večje število izoliranih celic smo Dynabeads® skupaj z DETACHaBEAD še 3x sprali s 500 µL pufra za spiranje in vsakokrat supernatant prenesli v isto 15 mL centrifugirko. Zbranim celicam smo dodali 10 mL pufra, jih nato centrifugirali 10 min pri $400 \times g$, da smo odstranili DETACHaBEAD in jih resuspendirali v pufru D-PBS ali gojitvenem mediju (Invitrogen, 2007).

Izolirane celice CD34+ smo prešteli s pomočjo hemocitometra Bürker-Türk po zgoraj opisanem postopku.



Slika 13: Shematski prikaz ločevanja celic CD34+ z uporabo Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System (Invitrogen, 2007)

3.2.5 Izolacija celic CD34+ iz vzorca MNC z Indirect CD34 MicroBead Kit-om

S komercialnim kitom Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System smo izolirali celice CD34+, ki so bile maloštevilčne in so vsebovale veliko nezaželenih magnetnih delcev, zato smo poskusili še z izolacijo s komercialnim kitom Indirect CD34 MicroBead Kit (slika 16) in upali, da bomo dobili večje število celic CD34+ in manjše število magnetnih delcev.

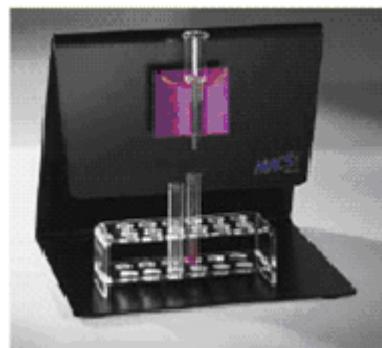
Tehnologija MACS se uporablja za izolacijo krvotvornih progenitorskih celic iz kostnega mozga, periferne in popkovnične krvi, ki na svoji površini izražajo antigen CD34. Celice CD34+ predstavljajo le 0,05-0,2 % v periferni krvi, 0,1-0,5 % v popkovnični krvi in 0,5-3 % v kostnem mozgu (Miltenyi Biotech, 2010).

Razlika od Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System je, da ločevanje poteka v kolonah (slika 14) ob prisotnosti zunanjega magnetnega polja (slika 15), ki povzroči nastanek visoko gradientnega magnetnega polja, v katerega se ujamejo tudi celice,

označene z minimalnim številom magnetnih delcev MACS MicroBeads. Matriks kolone sestavljajo feromagnetne kroglice prevlečene z dekstronom, ki omogoča hitro in nežno separacijo celic ter kemično vezavo biomolekul. Magnetni delci so tu vezani neposredno na protitelo v primerjavi s prvim kitom, kjer so magnetni delci vezani posredno. Magnetni delci so veliki okoli 50 nm in sestavljeni iz biorazgradljivega materiala. Neoznačene celice potujejo neovirano skozi kolono, označene celice pa lahko speremo iz kolone izven magnetenega polja s pomočjo bata (Miltenyi Biotech, 2008).



Slika 14: Kolona LS
(Miltenyi Biotech, 2010)

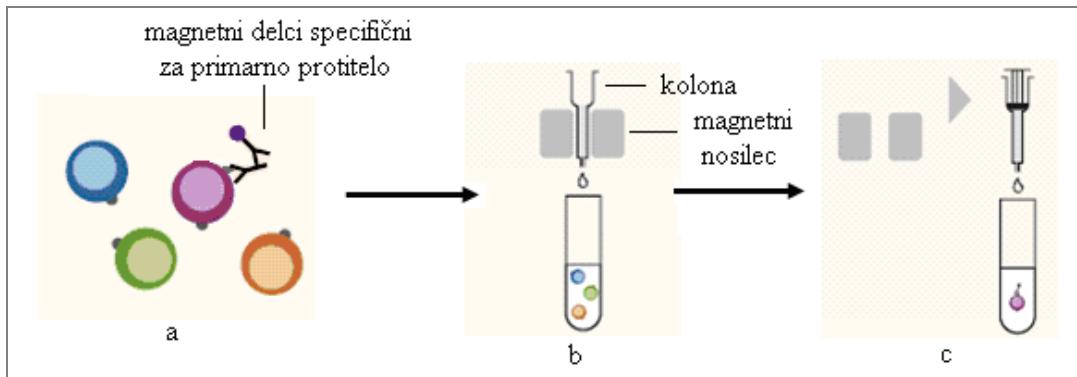


Slika 15: Magnetno stojalo
(Miltenyi Biotech, 2008)

Pred začetkom smo si pripravili pufer za spiranje, ki je sestavljen iz 2mM EDTA in 0,5% BSA v pufru D-PBS in ga ohladili pri 4°C. Ravno tako kot pri kitu Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System smo tudi pri Indirect CD34 MicroBead Kit s celicami delali hitro, jih ohranjali hladne in uporabljali predhodno ohlajene reagente, s čimer smo preprečili nespecifično vezavo protiteles na celice. Vzorec MNC ne sme vsebovati nobenih skupkov, ki bi lahko zamašili kolono in zmanjšali učinkovitost ločbe. Zato smo po potrebi celično suspenzijo spustili skozi sito s porami velikosti 40 µm. Nadaljni protokol je napisan za izolacijo 10^8 celic, količino uporabljenih reagentov pa smo po potrebi sorazmerno prilagodili dejanskemu številu celic.

V vzorcih MNC smo najprej določili koncentracijo celic s hemocitometrom. Nato smo vzorce centrifugirali na sobni temperaturi 10 min pri 300 x g. Po centrifugiranju smo popolnoma odstranili supernatant in resuspendirali pelet v 400 µl pufra za spiranje. Celični suspenziji smo dodali 100 µl FcR blocking reagenta, ki vsebuje človeška IgG in dobro premešali ter 100 µl CD34-Hapten-Antibody, ki vsebuje monoklonsko hapten-konjugirano protitelo (mišje IgG1) in dobro premešali. Nato smo inkubirali 15 minut na 4°C. Po inkubaciji smo sprali celice s 5-10 mL pufra za spiranje in centrifugirali 10 minut pri 300 x g. Supernatant smo zavrgli in pelet resuspendirali v 400 µl pufra za spiranje. Nato smo dodali 100 µl Anti-Hapten MicroBeads, ki vsebujejo magnetne delce vezane na anti-hapten protitelo. Dobro premešali in inkubirali pri 4 °C 15 minut. Po inkubaciji smo celice sprali z 1-2 mL pufra in centrifugirali na sobni temperaturi 10 minut na 300 x g. Supernatant smo zavrgli in pelet resuspendirali v 500 µl pufra za spiranje. V magnetni nosilec Mini MACS (slika 15) smo vstavili LS kolono (slika 14), jo sprali s 3 mL pufra za spiranje in nanj nanesli prej pripravljeno celično suspenzijo. Kolono smo še trikrat sprali s po 3 mL pufra za spiranje. Po spiranju smo kolono odstranili iz magneta na novo centrifugirko, nanesli še

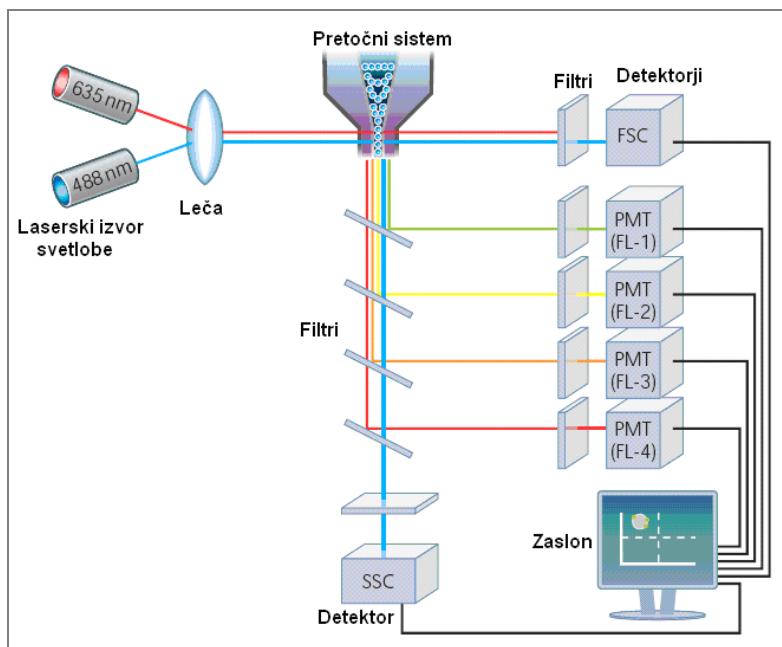
2 mL pufra za spirane in počakali da se je kolona spraznila. Nato smo dodali še 5 mL pufra za spiranje in z batom potisnili pozitivne celice CD34 iz kolone. Če bi želeli povečati čistost celic CD34, bi moramo ponoviti postopek na novi koloni (Miltenyi Biotech, 2010).



Slika 16: Shematski prikaz ločevanja celic CD34+ z uporabo sistema MACS. Celice najprej posredno označimo s kombinacijo primarnih protiteles specifičnih za CD34 in magnetnih delcev MACS MicroBeads, specifičnih za primarno protitele (a). Z magnetnim ločevanjem speremo neoznačene celice (b). Pozitivne celice CD34 izven magnetnega polja speremo iz kolone s pomočjo bata (c) (Miltenyi Biotec, 2008).

3.2.6 Identifikacija in karakterizacija celic CD34+ s pretočno citometrijo

Pretočna citometrija je tehnika s katero merimo kemijske in fizikalne lastnosti celic, ki v suspenziji ena za drugo potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe. Svetlobni žarek, ki zadene celico, se odbije ali lomi, ali pa se absorbira v določenih fluorokromih, ki nato izsevajo svetlobo večjih valovnih dolžin. Naprava omogoča hitro analizo in kakovostne statistične obdelave vzorcev, saj lahko izmeri do nekaj tisoč celic na sekundo.



Slika 17: Shematski prikaz pretočnega citometra (Rahman, 2006)

Za analizo s pretočnim citometrom (slika 17) potrebujemo celice v suspenziji. Pri prehodu skozi izvor svetlobe odda posamezna celica svetlobne signale, ki so odvisne od njenih lastnosti. Dva fotodetektorja merita količino razpršene svetlobe, ki jo oddaja obsevana celica. Prvi detektor je FALS (angl. Forward Angle Light Scatter) in se nahaja v ravnini poti laserskega žarka in omogoča zaznavo odbite svetlobe. Parameter, ki ga najpogosteje imenujemo »prednje sisanje« oz. FCS (angl. Forward Scatter), nastane zaradi kontakta s celičnimi membranami in je sorazmeren velikosti celice; čim večja je celica, tem večje je sisanje svetlobe in posledično signal, ki ga zaznamo na detektorju, ki sprejema razpršeno svetlobo iz smeri laserskega žarka. Fotodetektor RALS (angl. right angle light scatter) se nahaja pravokotno od poti laserskega žarka in omogoča zapis drugega parametra - »stransko sisanje« oz. SSC (angl. Side scatter), ki je premosorazmeren zrnatosti oz. granuliranosti posamezne celice. Več, kot je organelov oz. membranskih struktur, večje bo stransko sisanje in višji bo signal. V praksi je torej možno izolirati posamezne populacije celic dokaj enostavno preko zgoraj omenjenih parametrov sisanja.

Poleg morfoloških karakteristik lahko s pretočnim citometrom analiziramo tudi funkcionalne lastnosti celic. Pretočni citometer ima tudi dva do štiri fluorescenčne detektorje, ki prejemajo emitirano fluorescenčno svetlobo določene valovne dolžine in na ta način meri signal, ki ga oddaja določeno fluorescenčno barvilo. Fotodetektorji pretvorijo svetlobne signale v električne. Izmerjene vrednosti električnih signalov po računalniški obdelavi prikažemo matematično in grafično. O vsaki celici na ta način poleg podatkov o njeni relativni velikosti in zrnatosti dobimo še informacijo o vrsti in jakosti oddanih fluorescenčnih signalov. Metoda pretočne citometrije je v osnovi enaka metodi fluorescenčne mikroskopije, le da je odčitavanje odstotka obarvanih celice avtomatizirano, hitrejše in objektivnejše. Odstotek pozitivnih celic (celice, ki po reakciji s fluorescenčno označenimi protitelesi fluorescirajo) lahko zanesljivo izračunamo v primeru, da lahko jasno ločimo med pozitivnimi in negativnimi celicami (Rahman, 2006).

Za posamezen test potrebujemo 250.000 celic na 100 µl vzorca (50 µl na epruveto; 2 paralelki). Vzorce je potrebno pobarvati v 48 urah po odvzemu popkovnične krvi oz. kostnega mozga. Za barvanje smo uporabili BD Procount Progenitor Cell Enumeration Kit, ki vsebuje: BD Procount CD34 reagent, kateri vsebuje barvilo za nukleinske kisline in s fikoeritrim (PE) konjugirana monoklonska CD34 (klon 8G12) in s peridinin klorofilom (PerCP) konjugirana monoklonska CD45 (klon 2D1) protitelesa; BD Procount kontrolni reagent, ki vsebuje barvilo za nukleinske kisline in PE-monoklonska KLH γ_1 (IgG₁) (klon X40) ter PerCP- monoklonska CD45 (klon 2D1) protitelesa; BD Trucount epruvete ki vsebujejo liofiliziran pelet s fluorescentno obarvanimi kroglicami premora 4,2µm.

V prvo Trucount epruveto z natančno določenim številom fluorescentnih kroglic odpipetiramo 20 µl BD Procount CD34 reagenta in v drugo Trucount epruveto 20 µl BD Procount kontrolnega reagenta. Nato v obe epruveti dodamo 50 µl dobro premešanega vzorca PK ali KM. Oba reagenta in vzorec pipetiramo tik nad kovinsko membrano, pri čemer se ne dotikamo skupka kroglic. Epruvete zapremo in nežno premešamo ter inkubiramo 15 min na sobni temperaturi v temi. Po inkubaciji v vsako epruveto dodamo 450 µl 1 × BD FACS raztopine za lizo eritrocitov. Zapremo epruvete in nežno premešamo ter inkubiramo 30 min na sobni temperaturi v temi (BD Biosciences, 2010). Vzorce smo analizirali s pretočnim citometrom FACSCalibur™. Za merjenje parametrov FSC in SSC

ter detekcijo fluorokromov smo uporabili laser z valovno dolžino 488 nm. Za analizo rezultatov smo uporabili programsko opremo BD ProCOUNT. Po določenem času na pretočnem citometru odčitamo število preštetih fluorescentnih kroglic in celic CD34+. Iz teh podatkov in poznane koncentracije fluorescentnih kroglic v vzorcu izračunamo koncentracijo celic CD34+.

3.2.7 Določanje viabilnosti celic s pretočnim citometrom

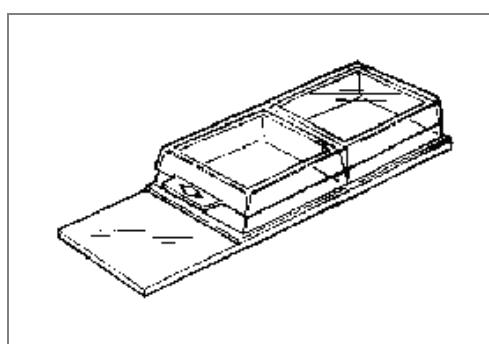
S postopkom določamo delež živih KMC v vzorcih kostnega mozga, periferni in popkovnični krvi. Suspenzijo celic obarvamo s protitelesi proti površinskemu označevalcu CD34 in 7-amino aktinomicinom (7-ADD) ter analiziramo s pretočnim citometrom. Protitelesa proti CD34 so označena z barvilo PE, katerega fluorescenco zaznavamo v rumenem delu spektra (448 nm).

7-ADD je že pripravljeno barvilo za nukleinske kisline, ki se uporablja za določanje mrtvih celic s pretočno citometrijo. Prednost tega barvila je v tem, da ga lahko uporabimo skupaj s PE ali FITC konjugiranimi monoklonskimi protitelesi za dvobarvne analize z minimalnim spektralnim prekrivanjem med fluorescentnimi emisijami 7-AAD, PE in FITC. Fluorescenco 7-AAD zaznavamo v dolgem rdečem delu spektra (650 nm).

50 µl vzorca redčimo v razmerju 1:1 s D-PBS in dodamo 15 µl protitels CD34 PE. Nežno premešamo celice in jih inkubiramo 15 min na sobni temperaturi v temi. Nato dodamo 5 µl barvila 7-AAD in nežno premešamo ter jih inkubiramo 10 min na sobni temperaturi v temi. Dodamo 400 µl 1× raztopine za lizo in analiziramo suspenzijo celic na pretočnem citometru.

3.2.8 Izolacija adherentnih celic CD34+

Po izolaciji smo celice CD34+ nasadili v komore za barvanje (slika 18) v RPMI mediju z 10% FBS. Nato smo jih 2h inkubirali v celičnem inkubatorju na temperaturi 37 °C in atmosferi s 5% CO₂. V tem času so se adherentne celice pritrstile na dno komore. Po inkubaciji smo nepritrjene celice sprali s pufrom D-PBS. Adherentne celice CD34+ predstavljajo manj kot 1 % vseh celic CD34+.



Slika 18: Komora za barvanje (Chamber slide, 1997)

3.2.9 Barvanje fenotipskih označevalcev

Princip ugotavljanja fenotipskih označevalcev je imunofluorescentno barvanje (slika 5), to je s fluorescentno označenimi protitelesi.

Po dveh urah inkubacije so se adhernetne celice CD34+ prilepile na dno komore. Odstranili smo gojišče in jih $1\times$ sprali s D-PBS pufrom. Nato smo celice 20 min inkubirali v fiksativu Accustain brez formalina, da bi preprečili razgradnjo proteinov. Po inkubaciji smo odstranili fiksativ in celice 3x sprali z D-PBS pufrom. Ker smo barvali tudi jedra smo morali permeabilizirati membrano. To smo naredili z 1% tritonom v PBS. Po 15 min inkubaciji smo celice sprali z $1\times$ D-PBS pufrom. Nato smo celice 45 min inkubirali v 10% normalnem kozjem serumu. Med tem smo pripravili različne redčitve primarnih protiteles v D-PBS pufru. Uporabili smo protitelesa proti površinskemu označevalcu Thy-1 in CD133. Obe protitelesi smo redčili v razmerju 1:250 z D-PBS pufrom. Celice smo prekrili s primarnimi protitelesi in jih inkubirali 1h na sobni temperaturi. Nato smo odstranili nevezana primarna protitelesa in celice 3x sprali z D-PBS pufrom. Pripravili smo redčitve sekundarnih protiteles v D-PBS pufru v razmerju 1:650. Uporabili smo protitelesa proti mišjim protitelesom. Celice smo prekrili s sekundarnimi protitelesi in jih inkubirali 1h v temi na sobni temperaturi, da smo zaščitili fluorescentne značke. Po inkubaciji smo nevezana sekundarna protitelesa odstranili in celice $1\times$ sprali z D-PBS pufrom, nato $1\times$ z DAPI-jem s katerim smo obarvali jedra in še $1\times$ s PBS-om. Na objektno stekelce smo kanili kapljico mounting medija in ga prekrili s krovnim stekelcem. Rob krovnega stekelca smo fiksirali z brezbarvnim lakom.

3.2.10 Identifikacija adherentnih celic CD34+ pod fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom

Pobarvane adherentne celice CD34+ smo opazovali pod fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom Zeiss Axioobserver Z1.

3.3 MATERIALI, REAGENTI IN APARATURE

3.3.1 Materiali

Preglednica 6: Seznam uporabljenih materialov

Okrajšava	Celo ime	Podjetje	Številka proizvoda
Centrifugirke 15 mL, 50 mL	Centrifugirne epruvete	Corning	25325-50
Pasterke	Pasteurjeve pipete	Copan Innovation	0326L06
Pipete 5 mL, 10 mL	Sterilne pipete	Starstedt	861254001 861253001
Pipete 50 mL	Sterilne pipete	Corning	4490
Tripsi 1000, 100, 10	Pipetni nastavki	Eppendorf	022491253 022491237
Gojitvene posodice	25 cm^2	Costar	3050
Skalpel		Braun	5518083
Krovna steklca	Krovna steklca	Brand	470055

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

LS kolona	LS kolona	Miltenyi Biotec	130-042-401
Komore za barvanje		Lab-Tek™	177429

3.3.2 Reagenti

Preglednica 7: Seznam uporabljenih reagentov

Okrajšava	Celo ime	Podjetje	Številka proizvoda
DPBS	Slana fosfatna puferska raztopina, brez Ca ²⁺ in Mg ²⁺ (Dulbeccos phosphate Buffered saline 1x)	Gibco	14190
RPMI	Gojišče "Roswell Park Memorial Institute"	Invitrogen	A10491
Lympholyte®-H	Lympholyte®-H	Cedarlane	CL5015
FBS	Fetal bovine serum	Gibco	16000-044
BSA	Bovine serum Albumin 25%	Gibco	A10008-01
Tripan	Tripantsko modrilo (Trypan Blue Solution)	Fluka	93595
Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System		Invitrogen	113.01D
Indirect CD34 MicroBead Kit		Miltenyi Biotec	130-046-701
ProLong® Gold antifade reagent with DAPI		Invitrogen	P36931
Fiksativ	Fiksativ brez formalina	Accustain	A577A
Triton	Triton-X 100	Sigma-Aldrich	X100-500M
Ovčji serum		Invitrogen	50-062Z
BD Procount Progenitor Cell Enumeration Kit		BD Biosciences	340-498
Raztopina za lizo BD FACS (10x)		BD Biosciences	349202
CD34 PE	CD34 fikoeritrin	BD Biosciences	555822
7-ADD	7-amino-aktinomicin	BD Biosciences	559925
Raztopina za lizo (10x)		BD Biosciences	555899
Protitelesa proti CD34	Mišja protitelesa IgG ₁ proti CD34	Abcam	ab6330
Protitelesa proti CD133	Mišja protitelesa IgG ₁ proti CD133	Santa Cruz	Sc-130127
Protitelesa proti CD90	Mišja protitelesa IgG ₁ proti CD90	Abcam	Ab23894
Protitelesa proti mišjim protitelesom	Kozja protitelesa proti mišjim protitelesom označena s Tx	Invotrogen	A21125

3.3.3 Aparature

Preglednica 8: Seznam uporabljenih aparatur

Aparatura	Podjetje
Centrifuga, model 5804R	Eppendorf
Pipetor	Integra
Magnetno stojalo Dynal Mag™-15	Invitrogen
Hemocitometer	Sigma
Celični inkubator	HERACell 150
Svetlobni mikroskop Eclipse TE300	Nikon
Fazno kontrastni fluorescentni mikroskop	Zeiss

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Avtomatske pipete 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Micronic, Brand
Vortex	Ika
Brezprašna komora, model SMBC 152AV	Iskra
Vodna kopel	BioTech
Hladilnik	Electrolux
Magnetno stojalo MidiMACS	Miltenyi Biotec
Pretočni citometer FACSCalibur™	BD Biosciences
Računalniški program ProCOUNT	BD Biosciences

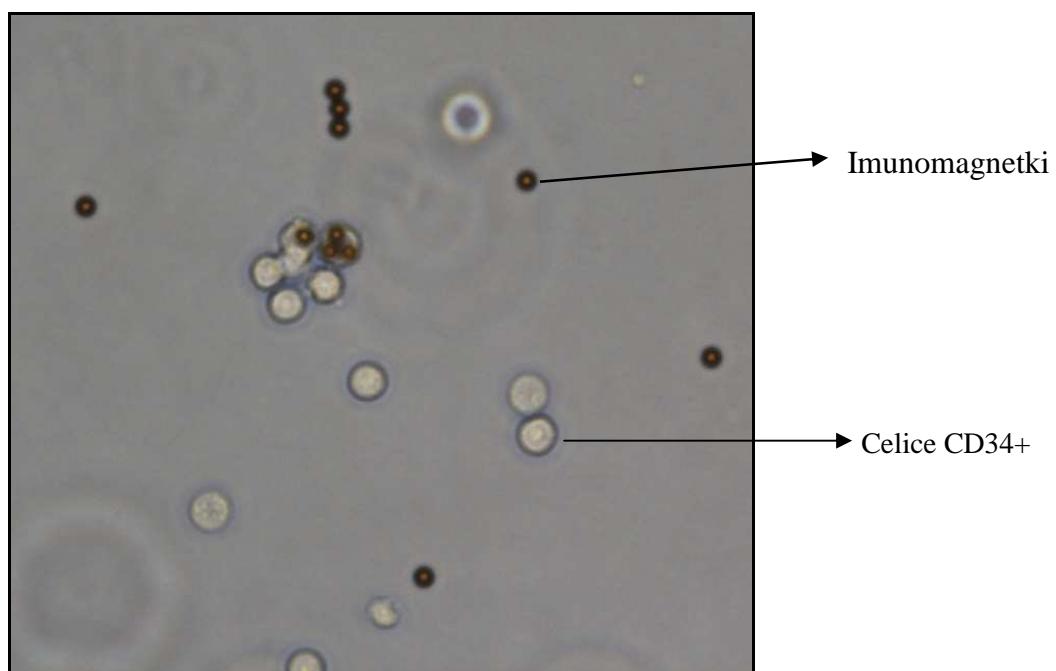
4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA MONONUKLEARNIH CELIC

Po obdelavi petih vzorcev kostnega mozga in petih vzorcev popkovnične krvi na gostotnem gradientu fikola z gostoto 1.077 g/mL smo MNC prešteli na Bürker-Türkovem hemocitometru. Iz kostnega mozga smo osamili med $1,8 \times 10^7$ in 1×10^8 celic/mL, iz popkovnične krvi pa med $4,6 \times 10^7$ in 2×10^8 celic/mL. Koncentracijo MNC smo potrebovali za določitev količin posameznih reagentov komercialnega kita, ki smo jih tem celicam dodali v nadalnjem postopku.

4.2 IMUNOMAGNETNA IZOLACIJA CELIC CD34+

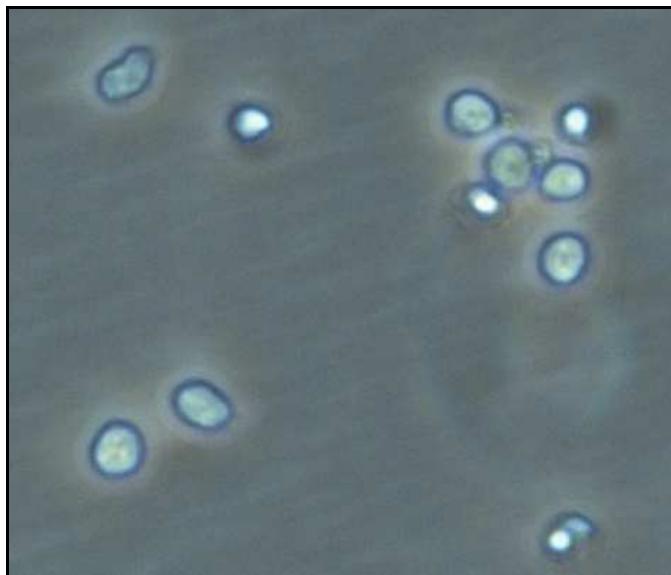
Najprej smo izolirati celice CD34+ iz kostnega mozga in popkovnične krvi s komercialnim kitom Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System, ki izolira le tiste celice, ki imajo na svoji površini izražen celični označevalec CD34 (slika 19). Magnetni delci so vezani neposredno na monoklonsko protitelo, kar zmanjša število spiranj in hkrati tudi izgubo celic. Na koncu dobimo celice CD34+ brez vezanih protiteles in magnetnih delcev. Izolirali smo med 1×10^5 in $3,5 \times 10^5$ CD34+ celic/mL.



Slika 19: Celice CD34+ izolirane z Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System, svetlobni mikroskop (Nikon Eclipse TE300, Japonska), povečava 400-krat.

Nato smo poskusili izolirati celice CD34+ še z Indirect CD34 MicroBead Kitom (slika 20), ki se od Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System razlikuje v tem, da ločevanje poteka v koloni, vzorce se večkrat centrifugira in manjkrat spira ter krajevski čas inkubira, kar skrajša tudi celoten postopek izolacije. Glavna razlika pa je, da so tu magnetni delci na monoklonsko protitelo vezani posredno in so biorazgradljivi. Magnetno označevanje v

dveh fazah je bistveno bolj učinkovito v primerjavi z enostopenjskim, kadar so celični označevalci šibko izraženi ali pa kadar uporabimo protitelesa z nizko afiniteto. S tem kitom smo izolirali med 4×10^5 in 1×10^6 celic CD34+/mL.

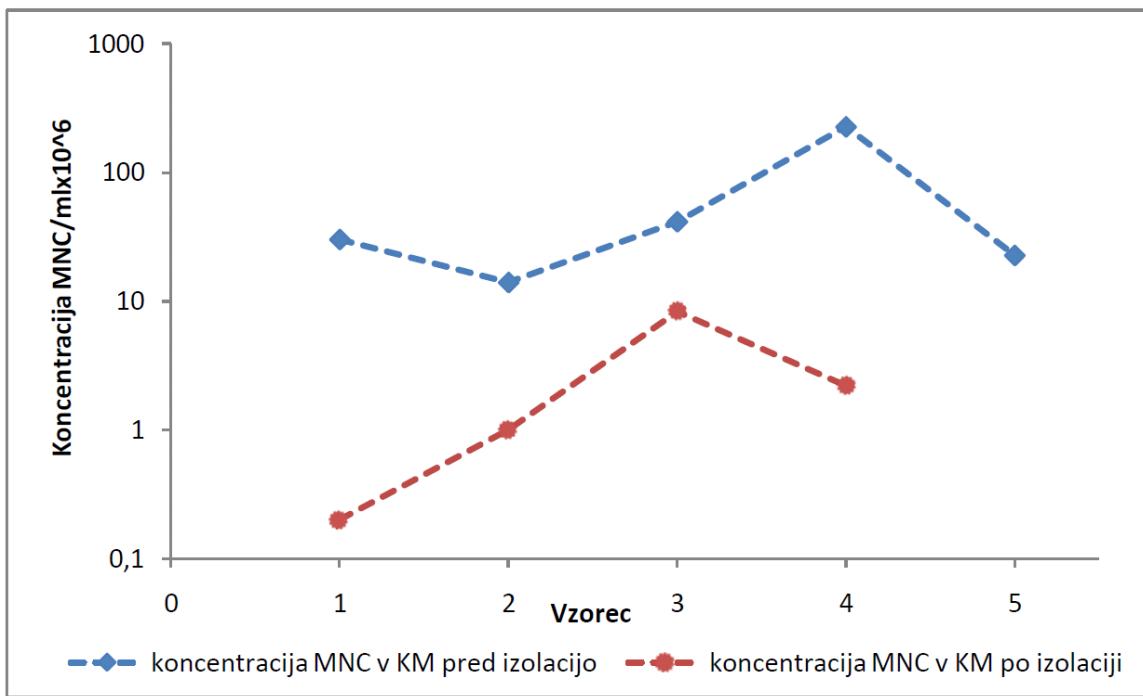


Slika 20: Celice CD34+ izolirane z Indirect CD34 MicroBead Kitom, svetlobni mikroskop (Nikon Eclipse TE300, Japonska), povečava 400-krat.

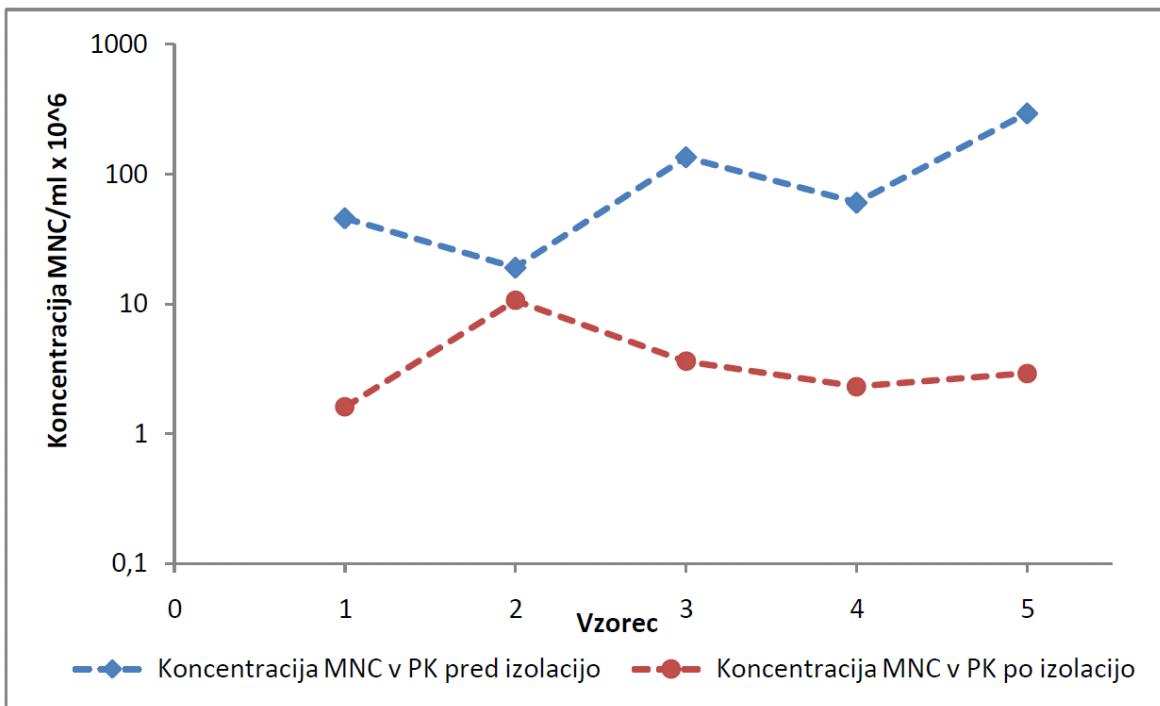
Zaradi krajšega postopka izolacije in večjega števila dobljenih celic smo celice CD34+ za analizo na pretočnem citometru in pod fluorescentnim mikroskopom izolirali iz vzorcev popkovnične krvi in kostnega mozga z Indirect CD34 MicroBead Kitom.

4.3 IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA CELIC CD34+ S PRETOČNO CITOMETRIJO

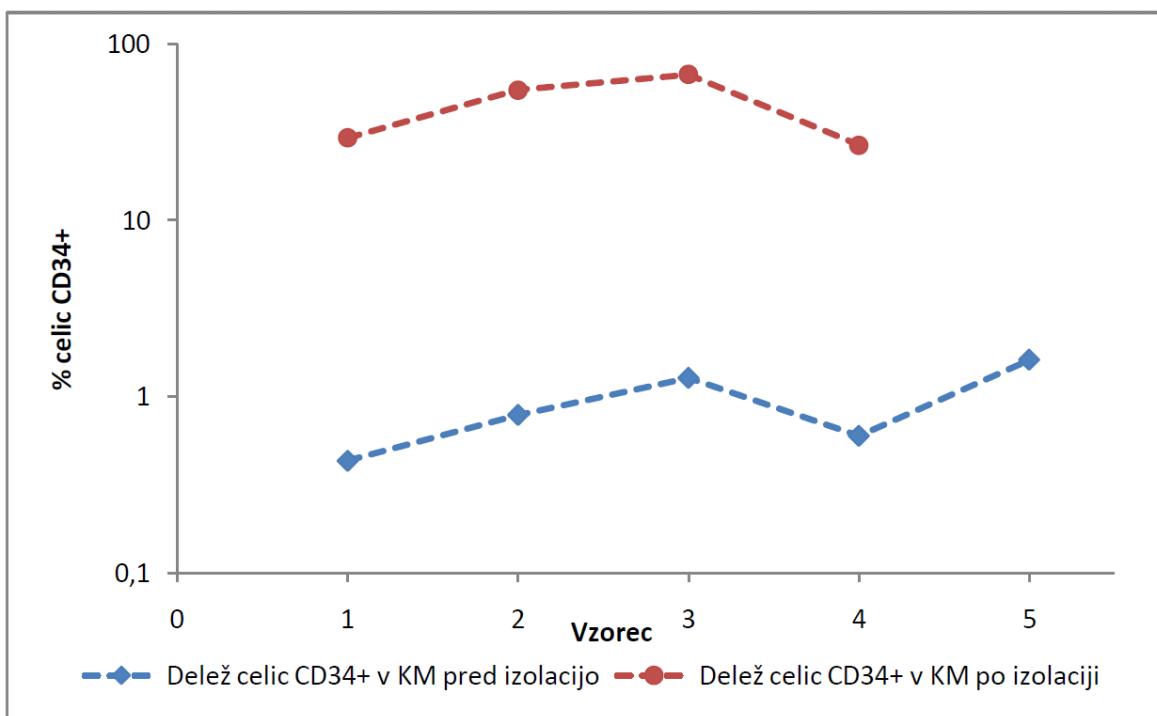
Vzorce pridobljene iz popkovnične krvi in kostnega mozga, smo pred in po imunomagnetni izolaciji, analizirali na pretočnem citometru. Osnovni rezultat pretočne citometrije je točkovni diagram, na katerem vsaka točka predstavlja posamezno celico. Položaj točke pa je odvisen od izmerjenih celičnih parametrov. Iz dobljenih podatkov smo izračunali koncentracijo MNC, delež celic CD34+ in izkoristek, kar prikazujejo grafi na slikah 21, 22, 23, 24, 25, 28 in 29. Izkoristek izolacije smo izračunali iz končnega in začetnega števila celic CD34+ v vzorcu.



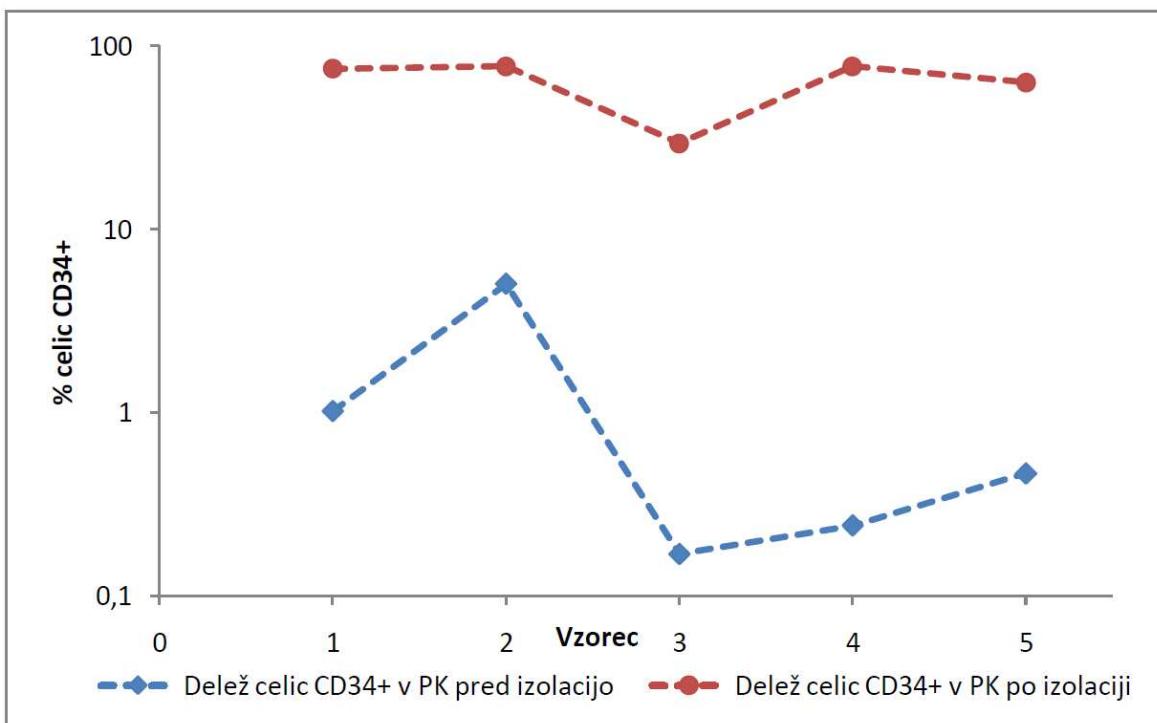
Slika 21: Koncentracija MNC/mL v kostnem mozgu pred in po izolaciji z Indirect CD34 MicroBead Kitom. Koncentracijo MNC v petem vzorcu kostnega mozga po izolaciji nismo mogli izmeriti, zaradi premajhnega števila izoliranih celic.



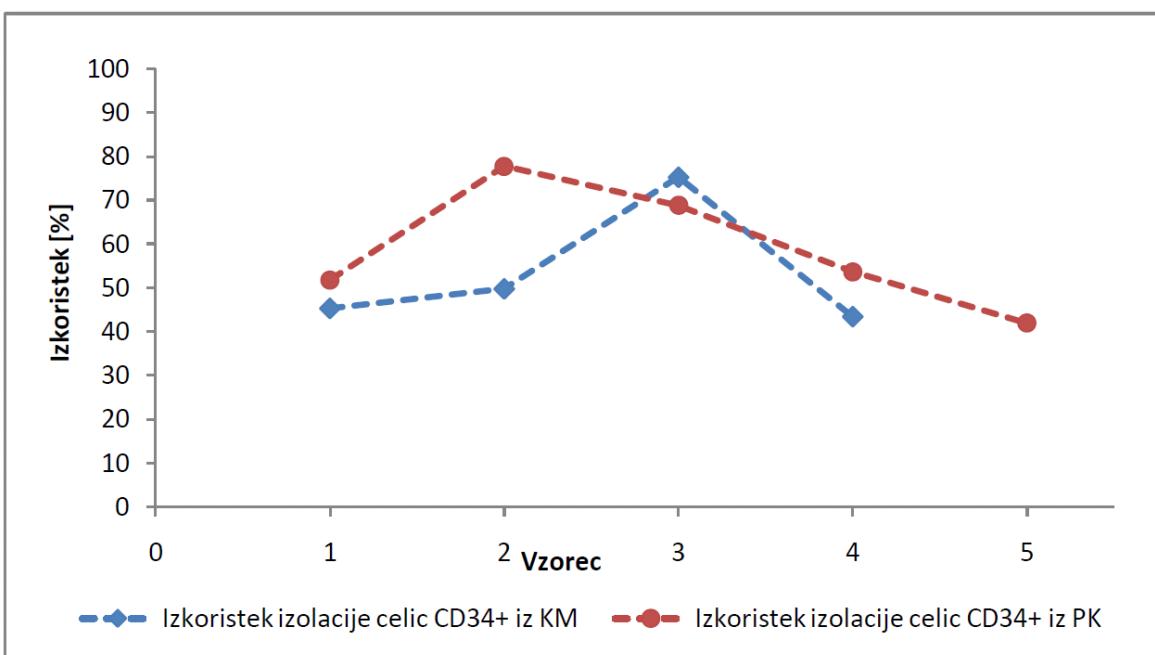
Slika 22: Koncentracija MNC/mL v popkovnični krvi pred in po izolaciji z Indirect CD34 MicroBead Kitom.



Slika 23: Delež celic CD34+ v kostnem mozgu pred in po izolaciji z Indirect CD34 MicroBead Kitom. Delež celic v petem vzorcu kostnega mozga po izolaciji nismo mogli izmeriti, zaradi premajhnega števila izoliranih celic.



Slika 24: Delež celic CD34+ v popkovnični krvi pred in po izolaciji z Indirect CD34 MicroBead Kitom.

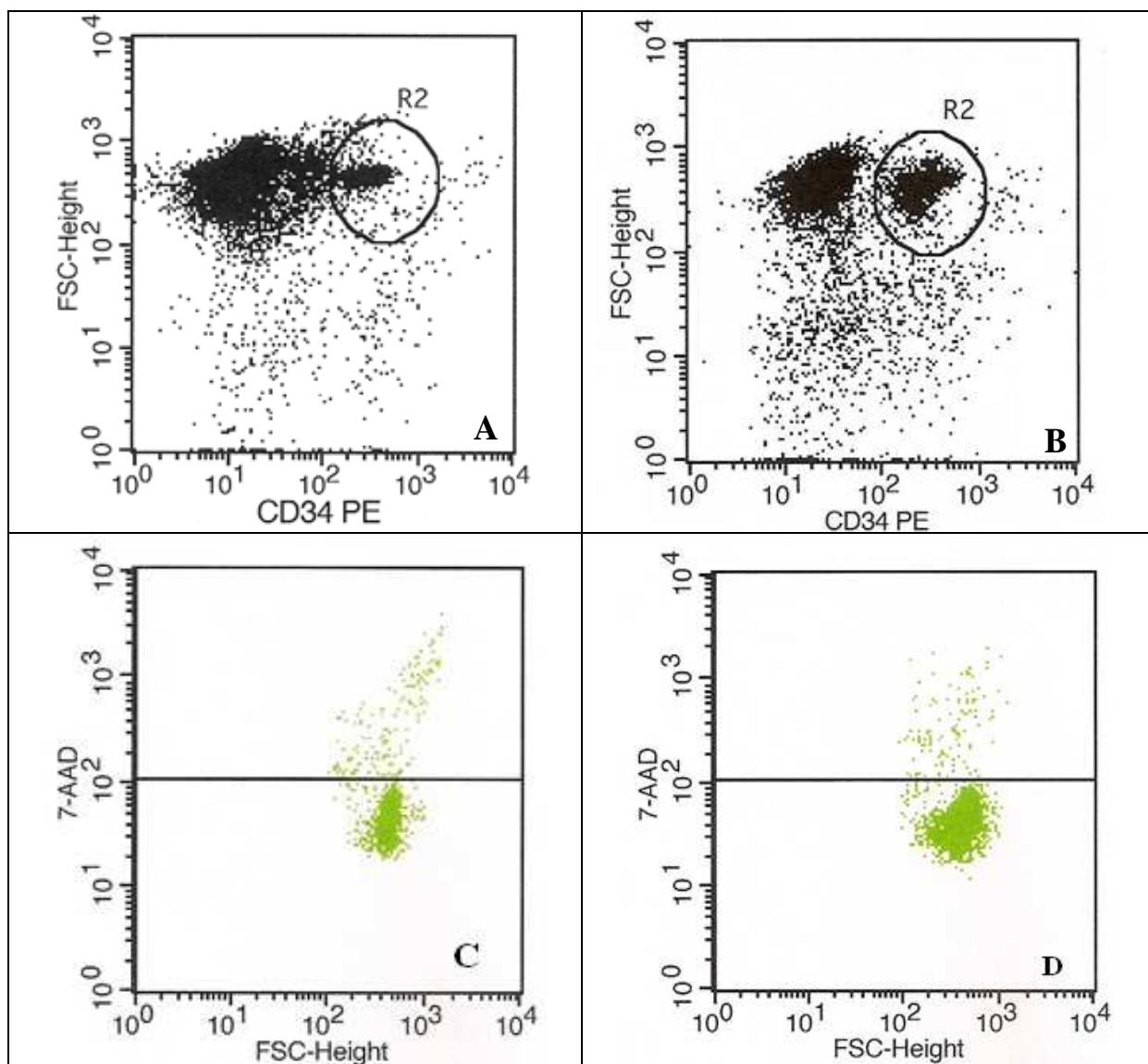


Slika 25: Izkoristek izolacije celic CD34+ iz popkovnične krvi in kostnega mozga. Izkoristek petega vzorca kostnega mozga nismo mogli izračunati, zaradi premajhnega števila izoliranih celic CD34+ po izolaciji.

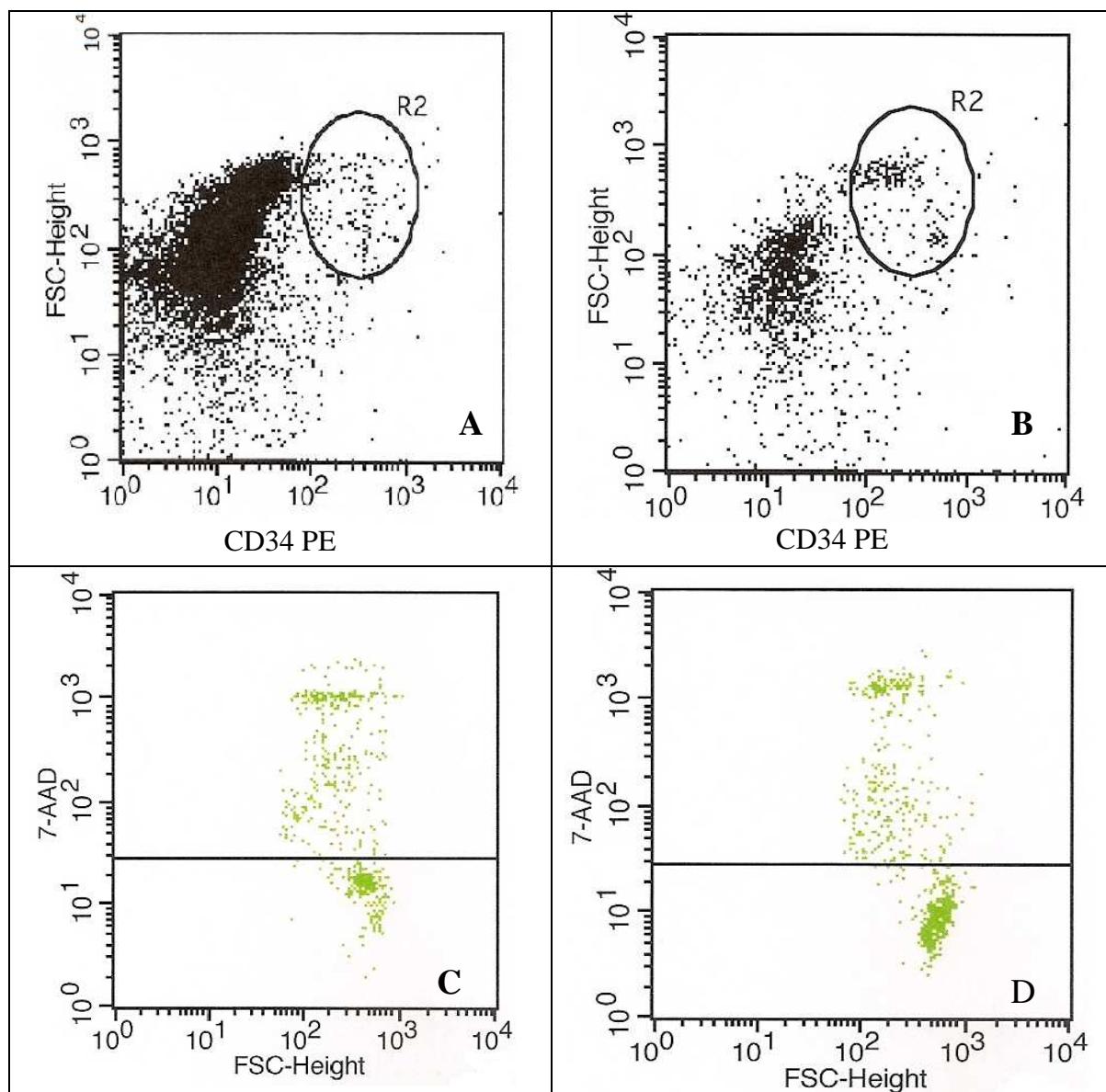
4.4 DOLOČANJE VIABILNOSTI CELIC CD34+ S PRETOČNIM CITOMETROM

Mrtve celice se od živih ločijo na točkovnem diagramu, pridobljenem s pretočno citometrijo po nižjem FSC in višjem SSC, vendar pa nam ta dva parametra v večini primerov ne zadoščata za ločbo med njimi, zato je potrebno celice pobarvati še z barvilkom 7-AAD.

Na diagramu FSC/CD34 PE, ki so prikazani na sliki 25A, 25B, 26A in 26B smo z računalniškim programom CellQuest določili regijo R2 in tako izbrali dogodke (celice), ki jih želimo v nadaljnji analizi. Regija R2 predstavlja celice CD34+. Nato so bile celice v označeni regiji R2 pobarvane še z barvilkom 7-AAD, kar prikazujejo diagrami 7-AAD/FSC na slikah 26C, 26D, 27C in 27D. Celice, ki so na diagramih prikazane nad črto so mrtve in pod njo so žive.

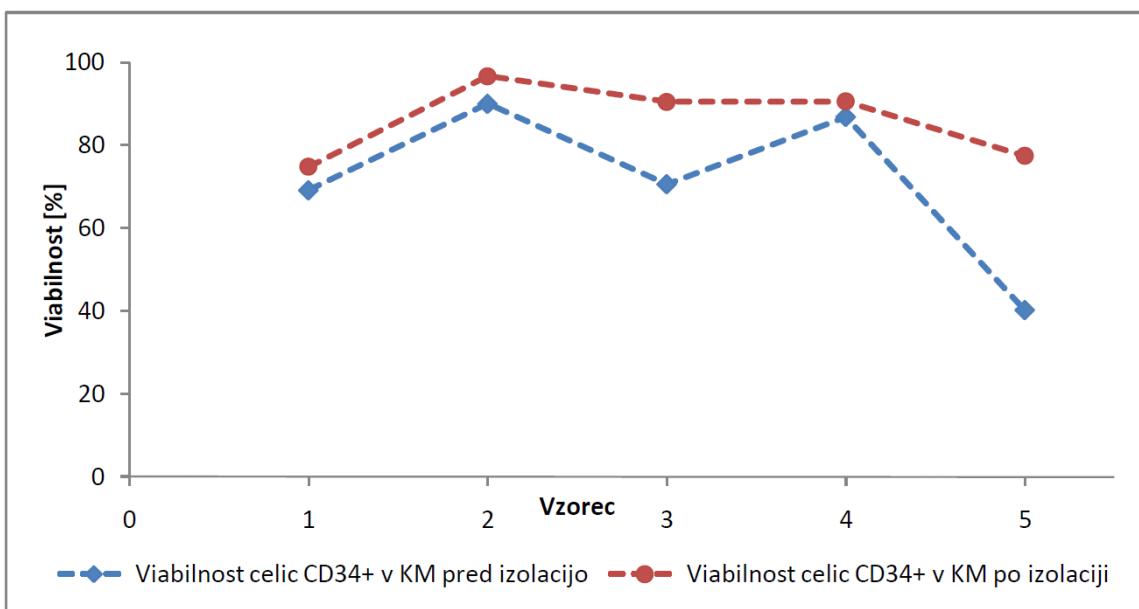


Slika 26: Analiza viabilnosti celic CD34+ v popkovnični krvi pred izolacijo (slika A in C) in po izolaciji z imunomagnetki (slika B in D). Regija R2 na diagramu A in B predstavlja celice CD34+. Celice, ki so na diagramih C in D prikazane nad črto so mrtve in pod njo so žive.

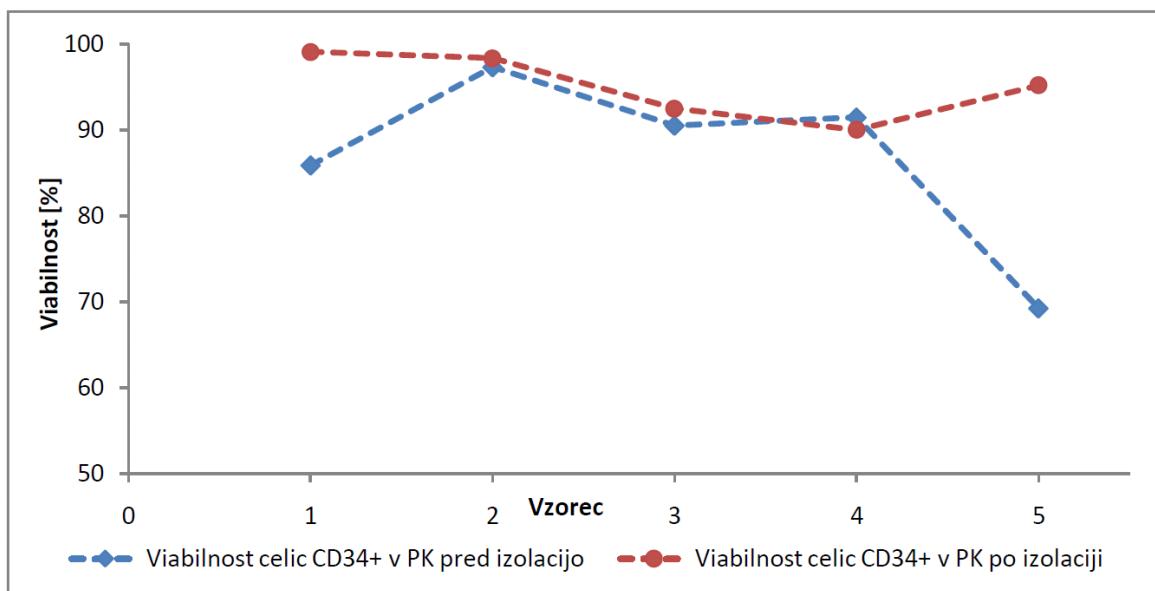


Slika 27: Analiza viabilnosti celic CD34+ v kostnem mozgu pred izolacijo (slika A in C) in po izolaciji z imunomagnetki (slika B in D). Regija R2 na diagramu A in B predstavlja celice CD34+. Celice, ki so na diagramih C in D prikazane nad črto so mrtve in pod njo so žive.

Rezultate viabilnosti celic CD34+, pridobljenih s pretočnim citometrom, smo prikazali na grafu na sliki 28 in 29.



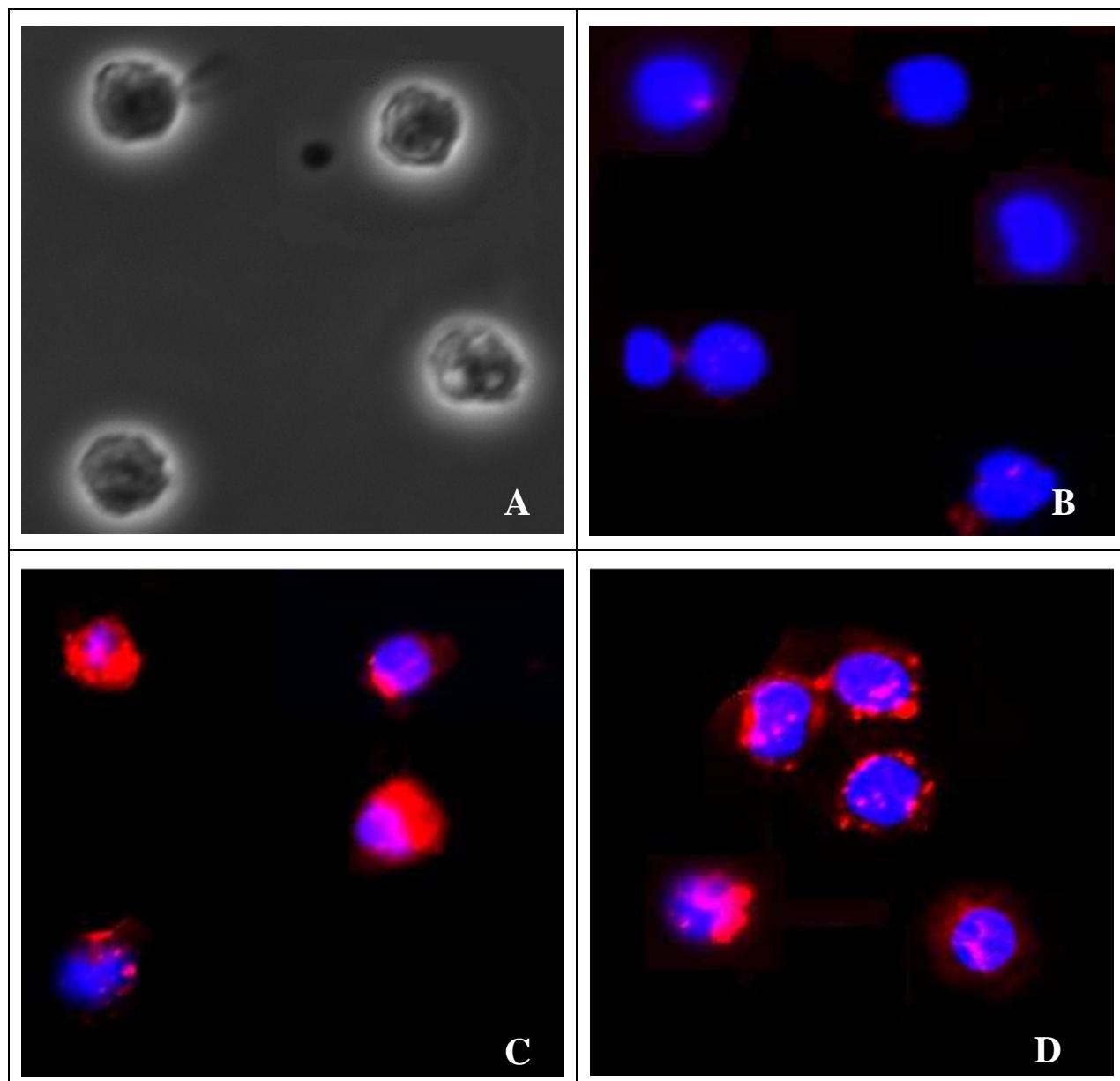
Slika 28: Viabilnost celic CD34+ v kostnem mozgu pred in po imunomagnetni izolaciji.



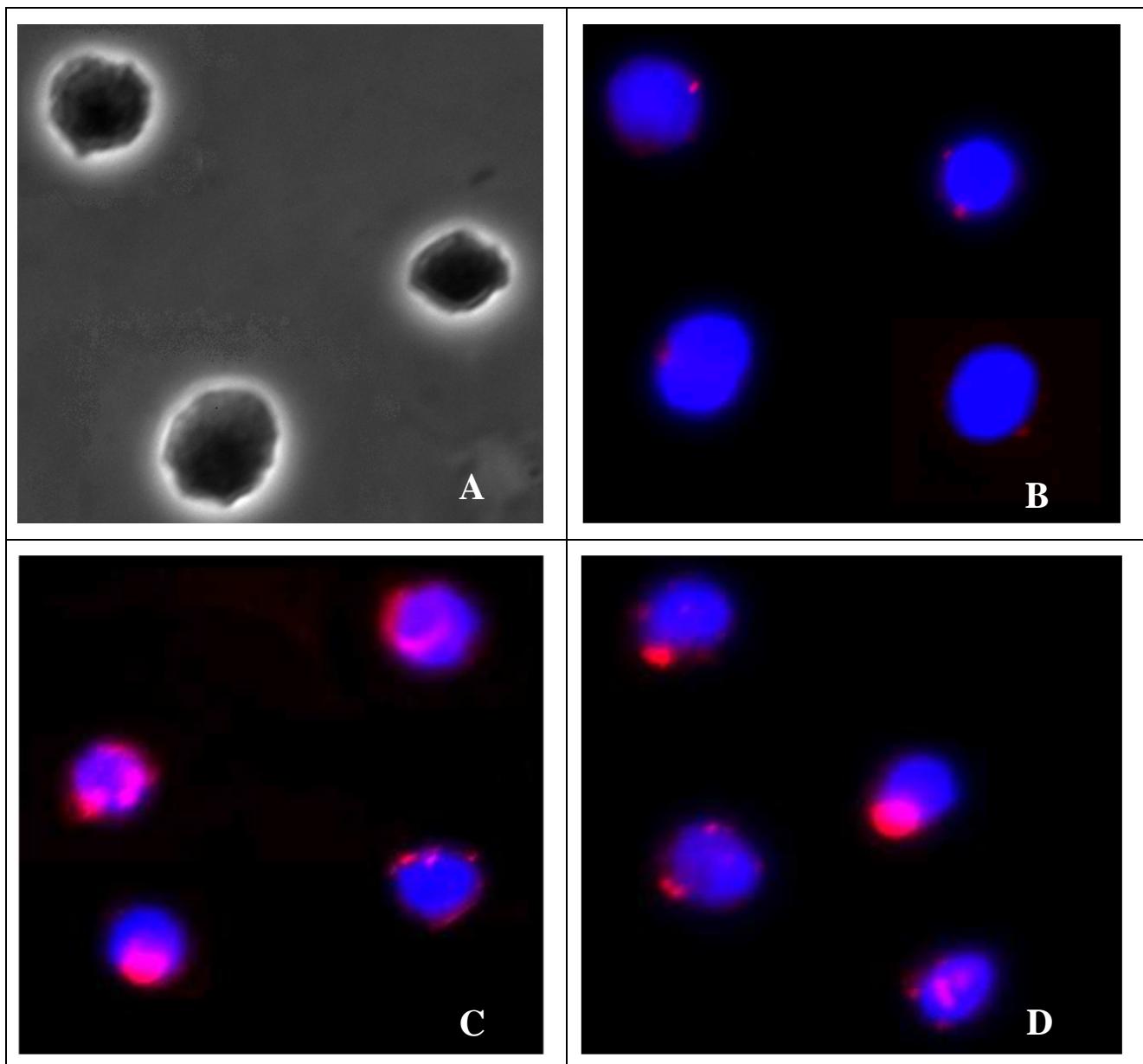
Slika 29: Viabilnost celic CD34+ v popkovnični krvi pred in po imunomagnetni izolaciji.

4.5 BARVANJE FENOTIPSKIH OZNAČEVALCEV IN ANALIZA POD FAZNO KONTRASTNIM FLUORESCENTNIM MIKROSKOPOM

Rezultati barvanja adherentnih celic CD34+ s fluorescentno označenimi protitelesi so prikazani na slikah 30 in 31. Modra barva prikazuje celična jedra, rdeča pa obarvane adherentne celice CD34+, ki imajo izražen celični označevalci CD133 in CD90. Pobarvane celice smo opazovali in fotografirali s fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom Zeiss Axioobserver Z1. Vse slike smo obdelali na enak način s pomočjo računalniškega programa AxioVision in MacBiophotonics ImageJ. Adherentne celice CD34+ predstavljajo manj kot 1 % vseh celic CD34+.



Slika 30: Adherentne celice CD34+ izolirane iz popkovnične krvi (slika A) označene s celičnim označevalcem CD133 (slika C) in CD90 (slika D). Slika B prikazuje negativno kontrolo. Modra barva prikazuje celična jedra, rdeča pa adherentne celice CD34+ označene z monoklonskimi protitelesi.



Slika 31: Adherentne celice CD34+ izolirane iz kostnega mozga (slika A), pobarvane s celičnim označevalcem CD133 (slika C) in CD90 (slika D). Slika B prikazuje negativno kontrolo. Modra barva prikazuje celična jedra, rdeča pa adherentne celice CD34+ označene z monoklonskimi protitelesi.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Matične celice so nespecializirane celice, ki imajo sposobnost samoobnavljanja, sposobnost diferenciacije v usmerjene celične vrste in sposobnost plastičnosti (Herberts in sod., 2011). Ker so primerne za terapevtsko uporabo na številnih področjih biomedicine, se število raziskav na tem področju hitro povečuje. Identificirane so bile v različnih odraslih tkivih. Mednje spadajo tudi adherentne krvotvorne matične celice imenovane omniciti, za katere se domneva, da imajo v odraslih tkivih vlogo pri zdravljenju poškodb in obnavljanju tkiva v jetrih (Gordon in Habib, 2005; Gordon in sod., 2006; Levičar in sod., 2007).

V zadnjem času je bilo objavljenih več raziskav, ki dokazujejo da je možno funkcijo cirotičnih jeter izboljšati z avtologno transplantacijo krvotvornih matičnih celic iz periferne krvi in kostnega mozga (Mohamadnejad in sod., 2007; Gordon in sod., 2006; Pai in sod., 2008). Jetrna ciroza je kronična bolezen jeter, pri kateri se tkivo jeter nadomešča z vezivnim tkivom. Jetra otrdijo in se skrčijo, s tem pa je njihovo delovanje moteno. Ta je največkrat posledica alkoholne jetrne bolezni (60% - 70%), kronične okužbe s virusoma hepatitisa B ali C (10%) in pa tudi metabolne ciroze (5%) (Bergauer in Dajčman, 2006). V Sloveniji povzroča cirozo letno 39 smrti na 100.000 prebivalcev in je na 4. mestu kot vzrok smrti. Raziskave o zdravljenju jetrne ciroze s krvotvornimi matičnimi celicami so v veliki večini pokazale signifikantno izboljšanje jetrne funkcije (Salama in sod., 2010; Pai in sod., 2008). Največja raziskava do sedaj je zajela 48 bolnikov (Salama in sod., 2010).

Zadnje čase je velik poudarek na izolaciji matičnih celic iz popkovnične krvi, saj ima kar nekaj prednosti v primerjavi z izolacijo celic iz kostnega mozga ali periferne krvi. Razlogi za to so predvsem lažja dostopnost in manjše tveganje za prenos virusnih okužb, saj v PK praviloma ni virusov, ki se pogosto pojavljajo v kostnem mozgu odraslih in zmanjšujejo uspeh presaditve. Manjše je tudi tveganje za nastanek bolezni presadka proti gostitelju (GvHD) po presaditvi. Hkrati v PK ni starostno pogojenih poškodb celic. Samo pridobivanje PK je neinvazivno in neškodljivo za mater in otroka, saj poteka brez kakršnegakoli posega v telo. Poleg tega se v popkovnični krvi nahajajo tudi številne druge matične celice, ki bi lahko predstavljale osnovo za nove terapevtske aplikacije (Gordon in Habib 2005; Ballen, 2005; Rocha in sod., 2006; Minn in Najem, 2011; Gluckaman, 2009).

Omnici se nahajajo v kostnem mozgu, periferni krvi, popkovnični krvi in fetalnih jetrih. V odraslih tkivih se nahajajo v zelo majhnem številu, kar močno otežuje njihovo nadaljnje raziskovanje in uporabo. Predstavljajo manj kot 1% vseh celic CD34+. Lahko izražajo površinske označevalce, kot so: CD34, CD133, c-met ali CD90 in ne izražajo označevalce za linijsko usmerjene celice kot so CD38, CD33, HLA/DR, CD19 in CD3. Vseh zgoraj naštetih individualnih površinskih označevalcev ni mogoče najti na vseh izoliranih celicah (Gordon in Habib, 2005). Zaradi majhnega števila omnicitov v kostnem mozgu in popkovnični krvi je njihova izolacija zelo zahtevna. Ker je dobljeno število adherentnih celic CD34+ po izolaciji iz popkovnične krvi in kostnega mozga premajhno, da bi jih pobarvali na vse zgoraj naštete površinske označevalce, smo jih pobarvali le na CD90 in CD133.

Vzorce popkovnične krvi za raziskavo smo dobili iz javne banke ESPOK na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, ki niso ustrezali standardom za dolgotrajno shranjevanje v tekočem dušiku. Vzorci so vsebovali manj kot 9×10^8 in več kot 7×10^8 levkocitov. Vzorce kostnega mozga smo dobili od prostovoljcev, ki so v diagnostičnem postopku na Kliničnem oddelku za hematologijo Kliničnega centra v Ljubljani.

Iz vzorcev popkovnične krvi ter kostnega mozga smo najprej izolirali mononuklearne celice s pomočjo gradientnega centrifugiranja. Pri tem smo se znebili predvsem eritrocitov in granulocitov, ki so se po centrifugiranju nahajali v peletu na dnu centrifugirke. Popkovnična kri v primerjavi s kostnim mozgom vsebuje relativno veliko trombocitov in eritrocitov, kateri imajo negativne vplive na izolacijo mononukleranih celic. Pri gradientnem centrifugiranju ni nujno, da vsi trombociti in eritrociti sedimentirajo na dno centrifugirke, ampak ostanejo na interfazi med fikolom in plazmo. Ti eritrociti, ki ostanejo na interfazi so jedrni progenitorji, ki naj bi ovirali nadaljnjo imunomagnetno selekcijo KMC (Kekarainen in sod., 2006). Tako po gradientnem centrifugiranju dobimo večje število celic, predvsem linijsko diferenciranih, kar pomeni tudi večjo porabo protiteles in s tem dražjo izolacijo. Poleg tega lahko eritrociti tvorijo skupke in s tem zamašijo kolono pri postopku imunomagnetne izolacije. Eritrocite bi lahko odstranili z uporabo amonijevega klorida ali dietilen glikola.

Koncentracija mononuklearnih celic določena s pretočnim citometrom je bila na volumsko enoto pred imunomagnetno izolacijo v popkovnični krvi med $1,9 \times 10^7$ in $2,9 \times 10^8$ in v kostnem mozgu med $1,4 \times 10^7$ in $2,3 \times 10^8$. Rezultati so grafično prikazani na slikah 21 in 22. Na manjše število mononuklearnih celic v kostnem mozgu je verjetno močno vplivala diagnoza in starost darovalca.

Viabilnost celic CD34+ smo prav tako izmerili s pretočnim citometrom. Celice smo obarvali s protitelesom proti celičnemu označevalcu CD34 in z barvilom za nukleinske kisline 7-amino aktinomicinom. Viabilnost celic CD34+ pred imunomagnetno izolacijo je bila v popkovnični krvi med 69% in 97%, v kostnem mozgu pa med 40% in 90%. Rezultati so grafično prikazani na slikah 28 in 29. Vzrok za manjšo viabilnost v kostnem mozgu v primerjavi s popkovnično krvjo bi lahko bila diagnoza in starost darovalca.

Delež celic CD34+, določen s pretočnim citometrom je pred imunomagnetno izolacijo pri petih vzorcih kostnega mozga znašal med 0,43% in 1,62% vseh MNC in v petih vzorcih popkovnične krvi med 0,17% in 5,04% glede na MNC. Rezultati so grafično prikazani na slikah 23 in 24. Hao in sod. so iz analiziranih 30 vzorcev popkovnične krvi dobili delež celic CD34+ med 0,02% in 1,43% glede na MNC ter v 16 vzorcih kostnega mozga je povprečni delež znašal 1,63% glede na MNC (Hao in sod., 2010). Fritsch in sod. so iz analiziranih vzorcev kostnega mozga dobili 5,37% povprečni delež celic CD34+ glede na MNC, iz popkovničnih krvi 1,1% glede na MNC in v periferni krvi stimulirani s citokini 1,79% glede na MNC (Fritsch in sod., 1996). Belvedere in sod. so analizirali 49 popkovničnih krvi in dobili povprečni delež celic CD34+ med 0,18% in 1,4% glede na MNC (Belvedere in sod., 1999). Melnik in sod. so analizirali 10 vzorcev popkovnične krvi in dobili delež celic CD34+ med 0,1% in 1,5% (Melnik in sod., 2001). Po podatkih iz člankov, bi moral biti torej delež celic CD34+ večji v kostnem mozgu kot v popkovnični krvi, znašal pa naj bi med 1% in 4% v kostnem mozgu in 1% v popkovnični krvi glede na

MNC. Glavni razlog za manjši delež celic CD34+ v kostnem mozgu v primerjavi z drugimi raziskavami in od deleža celic CD34 v popkovnični krvi je verjetno v diagnozi in starosti darovalca kostnega mozga. V zgoraj opisanih študijah je bil kostni mozeg pridobljen od zdravih prostovoljcev.

Število celic CD34+ je bilo v petih vzorcih kostnega mozga med $1,3 \times 10^5$ in $3,7 \times 10^6$ in v popkovnični krvi med 4×10^5 in $1,9 \times 10^6$. Podobne rezultate za popkovnično kri so dobili tudi Melnik in sod., in sicer med $4,4 \times 10^4$ in $3,0 \times 10^6$ celic (Melnik in sod., 2001).

Naslednji korak izolacije celic CD34+ je bila uporaba imunomagnetne selekcije pri kateri se lahko odločimo za pozitivno selekcijo na označevalce CD34 ali pa za negativno selekcijo z odstranitvijo vseh linijsko usmerjenih celic (Gordon in Habib, 2005). V tem primeru bi lahko brez uporabe ločevalnika fluorescenčno označenih celic izolirali želeno populacijo in se izognili možnosti kontaminacije, na primer, če bi nas zanimalo nadaljnje gojenje celic. Ločevalnik fluorescenčno označenih celic namreč ni popolnoma zaprt sistem, v katerem bi bila preprečena vsaka možnost okužbe. Nasprotno, lahko imunomagnetno ločevanje celic opravimo v aseptičnih pogojih znotraj brezprašne komore ali v zaprtih avtomatiziranih sistemih. Pomanjkljivost metode pa je v tem, da ne vemo natančno kakšno populacijo dobimo po izolaciji. Tako moramo opraviti dodatne analize z uporabo drugih metod, na primer s pretočno citometrijo.

Za prve izolacije celic CD34+ smo uporabili komercialni kit Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System, ker smo le-tega že imeli na zalogi. Tu so magnetni delci vezani neposredno na monoklonsko protitelo, kar zmanjša število spiranj in hkrati tudi izgubo celic. Ločevanje poteka v centrifugirki v zunanjem magnetnem polju. Na koncu dobimo celice CD34+ brez vezanih protiteles in magnetnih delcev. Izolirali smo med 1×10^5 in $3,5 \times 10^5$ celic/mL. Glede na to, da so v večini objavljenih člankov uporabili za imunomagnetno ločevanje Indirect CD34 MicroBead Kit, smo preizkusili izolacijo še z njim. Od Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System se razlikuje v tem, da ločevanje poteka v koloni. Vzorce se večkrat centrifugira in manjkrat spira ter krajevi čas inkubira, kar skrajša tudi celoten postopek izolacije. Glavna razlika pa je, da so tu magnetni delci na monoklonsko protitelo vezani posredno in jih ni potrebno odstraniti, saj so biorazgradljivi. Magnetno označevanje v dveh fazah je bistveno bolj učinkovito v primerjavi z enostopenjskim, kadar so celični označevalci šibko izraženi ali pa kadar uporabimo protitelesa z nizko afiniteto. S tem kitom smo izolirali med 4×10^5 in 1×10^6 celic/mL. Zaradi krajevga postopka izolacije in večjega števila dobljenih celic CD34+ smo za analizo na pretočnem citometru, barvanje fenotipskih označevalcev in analizo pod fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom, uporabili Indirect CD34 MicroBead Kit. Po imunomagnetni selekciji smo želeli preveriti kakšen delež celic CD34+ je vsebovala izolirana frakcija, izmeriti njihovo viabilnost in izračunati učinkovitost izolacije.

Koncentracija MNC po imunomagnetni izolaciji je bila v petih vzorcih popkovnične krvi med $1,6 \times 10^6$ in 1×10^7 celic/mL, medtem ko je bila v kostnem mozgu v štirih analiziranih vzorcih med 1×10^5 in $8,3 \times 10^6$ celic/mL. Rezultati so grafično prikazani na slikah 21 in 22. Iz grafa na sliki 21 je prav tako razvidno, da pri petem vzorcu kostnega mozga, koncentracije zaradi premajhnega števila dobljenih celic po izolaciji nismo mogli izmeriti. Če primerjamo rezultate izmerjene pred imunomagnetno izolacijo ugotovimo, da

se je koncentracija mononuklearnih celic zmanjšala tako v vzorcih popkovnične krvi kot tudi v vzorcih kostnega mozga, kar kaže na uspešno izolacijo celic CD34+. To pa smo potrdili še z deležem celic CD34+, ki je bil prav tako večji po imunomagnetni izolaciji, kar je razvidno iz grafov na slikah 23 in 24. Delež celic CD34+ je v vzorcih popkovnične krvi znašal med 29,4% in 77,7% glede na MNC in v kostnem mozgu med 26,8% in 67,3% glede na MNC. Pri petem vzorcu kostnega mozga zaradi premajhnega števila izoliranih celic (bilo jih je manj kot 200.000), ni bilo mogoče izmeriti deleža, kar je razvidno tudi iz grafa na sliki 23. Podobne rezultate je z uporabo enakega kompleta reagentov za izolacijo na 10 vzorcih popkovnične krvi dobila tudi raziskovalna skupina Melnik in sodelavci. (Melnik in sod., 2001). Belvedere in sod. so analizirali 49 vzorcev popkovnične krvi in po prvi imunomagnetni separaciji z uporabo kompleta reagentov Indirect CD34 progenitor cell isolation kit dobili med 8,2% in 80,2% delež celic CD34+ in ga po drugi imunomagnetni separaciji na novi koloni povečali med 67,6% in 96,4%. Testirali so tudi negativne frakcije pridobljene pri izolaciji in dobili po prvi koloni med 0,01% in 0,39% delež celic CD34+, ter po ponovni separaciji na novi koloni med 0,05% in 15% celic CD34+ (Belvedere in sod., 1999). Z večkratno izolacijo lahko torej povečamo delež iskanih celic, vendar pa je pri tem potrebno upoštevati, da med samim postopkom tudi izgubljamo število celic. Kekarainen in sod. so za izolacijo celic CD34+ iz popkovnične krvi uporabili Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit in dobili manj kot 50% čistost. Nato so metodo optimizirali in celice na koloni večkrat sprali s pufrom za spiranje ter dobili 80% čistost, vendar pri tem zmanjšali izkoristek izolacije kar za 50% pričakovanega izkoristka. Z izolacijo na dveh kolonah so dobili 77% povprečno čistost, vendar je kljub temu prišlo do velikih izgub celic med samim postopkom. Nato so po prvi izolaciji na koloni ponovili postopek vezave s protitelesi proti celičnemu označevalcu CD34 in dobili več kot 90% povprečno čistost celic CD34+ (Kekarainen in sod., 2006). Glede na zgornje rezultate, bi bila za dosego visokega deleža celic CD34+ najboljša in najcenejša uporaba dveh kolon za ločevanje, vendar bi pri tem izgubili tudi precejšen delež celic. Ponovna vezava protiteles na celice CD34+ po prvi separaciji na koloni je tudi uspešna, vendar veliko dražja metoda za doseganje visokega deleža izoliranih celic.

Z merjenjem viabilnosti celic CD34+ na pretočnem citometru smo želeli preverili ali imunomagnetna izolacija na kakršenkoli način poškoduje celice. Viabilnost celic CD34+ je bila po imunomagnetni izolaciji v popkovnični krvi med 90% in 99% in v vzorcih kostnega mozga med 74,8% in 96,7%. Rezultati so grafično prikazani na slikah 28 in 29. Vzrok za manjšo viabilnost v kostnem mozgu v primerjavi s popkovnično krvjo bi lahko bila diagnoza in starost darovalca. Čeprav imunomagnetna izolacija ne vpliva na viabilnost celic, pa naj bi vezava protiteles na površino KMC vplivala na celično proliferacijo in diferenciacijo z aktivacijo intracelularnih signalnih poti (Lang in sod., 2004) in sicer je bilo dokazano, da inducira fosforilacijo celic CD34+ iz kostnega mozga (Tada in sod., 1999). To bi lahko preprečili z negativno izolacijo, kjer vezava protiteles in s tem aktivacija signalnih poti ni pričakovana.

Izračunali smo tudi uspešnost izolacije, ki je za vzorce popkovnične krvi znašala med 42% in 78% ter za vzorce kostnega mozga med 43% in 75%. Rezultati so grafično prikazani na slikai 25. Za peti vzorec kostnega mozga, nismo mogli izračunali izkoristka, zaradi premajhnega števila izoliranih celic, kar je tudi razvidno iz grafa na sliki 25. Podobne rezultate so dobili tudi Kekarainen in sod. (2006) ter Belvedere in sod. (1999).

Ostanek celic CD34+, ki jih nismo uporabili za analize na pretočnem citometru smo pobarvali na specifične površinske celične označevalce ali pa jih poskusili namnožiti. Po imunomagnetni izolaciji celic CD34+ smo izolirali še subpopulacijo teh celic in sicer adherentne celice, ki predstavljajo manj kot 1% celic CD34+. Adherentne celice so se v 2h pritrstile na dno gojilne posodice in se v nadalnjih 72 urah tudi odlepile od podlage. Za namnoževanje adherentnih celic CD34+ smo uporabili inaktiviran medij fibroblastov, ki predstavlja zалогом pomembnih rastnih faktorjev (G-CSF, IL-3, SCF in GM-CSF), ki spodbujajo rast in proliferacijo omnicitov. Kulturo adherentnih celic CD34+ nam je uspelo vzdrževati 10 dni, vendar ni bilo videti, da bi se celice namnožile. Ker dobimo zelo malo celic po imunomagnetni izolaciji bi lahko bil vzrok za neuspešno namnoževanje premajhna gostota nasaditve in posledično pomanjkanje medceličnega komuniciranja ter izločanje citokinov in rastnih faktorjev, neoptimalna sestava gojišča ali količina seruma. Potrebno bi bilo poskusiti namnoževanje celic v metilceluloznem mediju, ki bi vseboval citokine G-CSF, SCF, GM-CSF kot je to že uspelo Habibu in sod., vendar zaradi omejenih denarnih sredstev tega nismo poskusili.

Da bi preverili, če smo res izolirali omnicate smo adherentne celice CD34+ izolirane iz kostnega mozga in popkovnične krvi pobarvali še s protitelesi proti površinskim označevalcema CD90 in CD133 in jih nato opazovali pod fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom, kar prikazuje sliki 30 in 31. Modra barva prikazuje celična jedra, rdeča pa obarvane adherentne celice CD34+, ki imajo izražen celični označevalce CD133 in CD90. Vidimo lahko, da so se celice izolirane iz popkovnične krvi obarvale intenzivneje. Pri negativni kontroli so tako pri kostnem mozgu kot tudi pri popkovnični krvi le nekatere celice na posameznih odsekih obarvane bledo rdeče kar pomeni, da so celice na slikah 30C, 30D, 31C in 31D verjetno res omnici. Poleg imunološkega dokazovanja antigenov s celičnimi označevalci bi lahko izolirano populacijo KMC identificirali tudi z molekularnimi tehnikami kot so: PCR, RT-PCR ali z uporabo DNA-mikromrež.

Zaključili bi lahko, da je metoda imunomagnetne selekcije primerna za izolacijo celic CD34+ iz popkovnične krvi in kostnega mozga. Vendar pa pri tem ne upoštevamo izgub, ki nastanejo pri izolaciji. Z barvanjem celičnih površinskih označevalcev proti CD90 in CD133 smo dokazali, da naj bi tako popkovnična kri kot kostni mozev vsebovala adherentno populacijo KMC, imenovanih omnici. Za boljšo karakterizacijo, bi morali celice namnožiti s pomočjo ustreznih rastnih faktorjev in jih obarvati še na druge značilne celične površinske označevalce. V nadalnjih raziskavah bi lahko narediti še RT-PCR in preveriti izražanje transkripcijskih dejavnikov Oct 4, Rex-1 in Nanog.

V prihodnje je torej potrebno poskuse ponoviti v večjem obsegu, da bi lahko ocenili zanesljivost in ponovljivost rezultatov. Postopek izolacije adherentnih celic CD34+ bi bilo potrebno še dodatno optimizirati, ki bi omogočal pridobitev večjega števila celic. Njihovo prisotnost v izoliranih vzorcih pa je potrebno potrditi s preverjanjem izražanja označevalcev na ravni mRNA.

5.2 SKLEPI

- V popkovnični krvi in kostnem mozgu smo identificirali omnicite, ki so definirane kot adherentna populacija krvotvornih matičnih celic, pozitivna za označevalce CD34, CD90 in CD133 ter negativna za označevalce linijsko usmerjenih celic.
- Komercialni kit Indirect CD34 MicroBead Kit je primeren za osamitev KMC.
- Večje število celic CD34+ smo dobili v popkovnični krvi kot v kostnem mozgu, kar je nasprotajoče z obstajajočo literaturo. Glavni vzrok je verjetno v vzorcih kostnega mozga, ki so bili pridobljeni od prostovoljcev z različnimi obolenji.
- Za boljše rezultate bi bilo potrebno pridobiti vzorce kostnega mozga od zdravih darovalcev ter analizirati večje število vzorcev.
- Viabilnost je po izolaciji ostala enaka oz. se je povečala, kar najverjetneje pomeni, da imunomagnetna izolacija ne vpliva na viabilnost celic.

6 POVZETEK

Človeško telo je sestavljeno iz organov in tkiv, ki s svojim specifičnim delovanjem omogočajo delovanje telesa kot celote. Vsako tkivo sestavljajo kratko živeče diferencirane celice, od katerih ima vsaka posebno in specializirano nalogu in morajo nenehno nastajati. Za ta proces skrbijo dolgo živeče matične celice, ki so drugačne od specializiranih celic, saj imajo poleg sposobnosti asimetričnega deljenja in diferenciacije še sposobnost samoobnavljanja in razvoja v celice različnih tkiv, ne le v tiste, iz katerih izvirajo. Na ta način naš organizem ustvari ustrezno zalogu funkcionalnih celic. Različne matične celice se razlikujejo glede na svoje morfološke značilnosti, metode gojenja in diferenciacijski potencial.

Matične celice so bile identificirane v različnih odraslih tkivih. Mednje spadajo tudi adherentne krvotvorne matične celice imenovane omnici, za katere se domneva, da imajo v odraslih tkivih vlogo pri zdravljenju poškodb in obnavljanju tkiva v jetrih. So okrogle, majhne mononuklearne celice s premerom 7-15 μm , z visokim razmerjem jedra in citoplazme, ki se lahko diferencirajo v vse tri zarodne plasti (ektoderm, mezoderm in endoderm). Izolira se jih lahko iz odraslega kostnega mozga, periferne krvi, pokovnične krvi in fetalnih jeter. So multipotentne in predstavljajo nov vir celic za tkivno avtologne transplantacije. V odraslih tkivih se nahajajo v zelo majhnem številu, kar močno otežuje njihovo nadaljnje raziskovanje in uporabo. Predstavljajo manj kot 1% vseh CD34+ celic. Lahko izražajo površinske označevalce, kot so CD34, CD133, c-met ali CD90 in ne izražajo označevalcev za linijsko usmerjene celice kot so CD38, CD33, HLA/DR, CD19 in CD3. Vseh zgoraj naštetih individualnih površinskih označevalcev ni mogoče najti na vseh izoliranih celicah (Gordon in Habib, 2005). Zaradi majhnega števila omnicotov v kostnem mozgu in v popkovnični krvi je njihova izolacija zelo zahtevna.

Izolacija matičnih celic iz popkovnične krvi ima kar nekaj prednosti v primerjavi z izolacijo celic iz kostnega mozga ali periferne krvi. Razlogi za to so predvsem lažja in dostopnost in manjše tveganje za prenos virusnih okužb, saj v PK praviloma ni virusov, ki se pogosto pojavljajo v kostnem mozgu odraslih in zmanjšujejo uspeh presaditve. Manjše je tudi tveganje za nastanek bolezni presadka proti gostitelju (GvHD) po presaditvi. Hkrati v PK ni starostno pogojenih poškodb celic. Samo pridobivanje PK pa je neinvazivno in neškodljivo za mater in otroka, saj poteka brez kakršnegakoli posega v telo. Poleg tega se v popkovnični krvi nahajajo tudi številne druge matične celice, ki bi lahko predstavljale osnovo za nove terapevtske aplikacije (Gordon in Habib 2005; Ballen, 2005; Rocha in sod., 2006; Minn in Najem, 2011; Gluckman, 2009).

V diplomskem delu smo žeeli v vzorcih popkovnične krvi in kostnega mozga z analizo na pretočnem citometru in z barvanjem fenotipskih označevalcev identificirati populacijo adherentnih krvotvornih matičnih celic ter oceniti primernost metod za njihovo izolacijo. Prav tako smo preverili vpliv imunomagnetne izolacije na viabilnost celic CD34+. Najprej smo iz vzorcev popkovnične krvi in kostnega mozga osamili mononuklearne celice s pomočjo gradientnega centrifugiranja. Nato smo analizirali vzorce na pretočnem citometru in iz podatkov izračunali koncentracijo MNC, delež celic CD34+, izkoristek izolacije ter določili viabilnost. Izolirane celice CD34+ smo nato nasadili v plastične oziroma steklene posodice in ugotovili, da so se v obeh primerih pritrstile na podlagu. Pritrjene celice smo

nato pobarvali s protitelesi proti celičnima označevalcema CD133 in CD90. Pobarvane celice smo opazovali pod fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom. Celice so bile pozitivne na oba celična označevalca.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da popkovnična kri in kostni možeg vsebujejo omnice. V prihodnosti je potrebno še dodatno optimizirati postopke za njihovo izolacijo in identifikacijo ter razvoj metod za uspešno namnoževanje in diferenciacijo. Predvidevamo, da bodo te celice dober vir matičnih celic za uporabo v celičnih terapijah in regenerativni medicini.

7 LITERATURA

- Akashi K., Kondo M., Weissman I.L. 1999. Mammalian common lymphoid progenitor cell. World Intellectual Property Organisation WO 99/10478. AbD Serotec. Human CD Antigen Expression. 2006.
<http://www.abdserotec.com/uploads/human-cd-antigen-expression.pdf> (18.05.2010)
- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., and Isner J.M. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275, 5302: 964–967
- Bailey A.S., Jiang S., Afentoulis M., Baumann C.I., Schroeder D.A., Olson S.B., Wong M.H., Fleming W.H. 2004. Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood*, 103, 1:13-19
- Baker B., Vlad I., Barbre J., Moh M., Chen R., Bliss S. Stem Cell and Regenerative Medicine. Graduate school of biomedical science, University of Medicine & Dentistry of New Jersey
<http://njms.umdnj.edu/gsbs/stemcell/scofthemonth/CSCsci.htm> (24.3.2010)
- Barker J.N., Weisdorf D.J., Wagner J.E. 2001. Creation of a double chimera after the transplantation of umbilical-cord blood from two partially matched unrelated donors. *New England Journal Medicine*, 344, 24: 1870–1871
- Balaji A.B., Jamil K., Maruthiram G., Habibulla C.M. 2010. Isolation of a novel population of multipotent stem cells from epidermal layer of human skin. *Biology and Medicine*, 2, 2: 57-67
- Ballen K.K. 2005. New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood*, 105, 10: 3786-37892
- BD Procount Progenitor Cell Enumeration Kit. 2010. USA, BD Biosciences: 15 str.
- Beare A., Stockinger H., Zola H., Nicholson I. 2008. Monoclonal Antibodies to Human Cell Surface Antigens. *Current Protocols in Immunology*, Appendix 4:4A
- Beltrami A.P., Cesselli D., Bergamin N., Marcon P., Rigo S., Puppato E., D'Aurizio F., Verardo R., Piazza S., Pignatelli A., Poz A., Baccarani U., Damiani D., Fanin R., Mariuzzi L., Finato N., Masolini P., Burelli S., Belluzi O., Schneider C., Beltrami C.A. 2007. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood*, 110, 9: 3438-3446
- Belvedere O., Feruglio C., Malangone W., Bonora M.L., Donini A., Dorotea L., Tonutti E., Rinaldi C., Pittino M., Baccarani M., Del Frate G., Biffoni F., Sala P., Hilbert D.M., Degrassi A. 1999. Phenotypic characterization of immunomagnetically purified umbilical cord blood CD34+ cells. *Blood Cells, Molecules and Disease*, 25, 9: 140-145

Bensinger W.I., Martin P.J., Storer B., Clift R., Forman S.J., Negrin R., Kashyap A., Flowers M.E., Lilleby K., Chauncey T.R., Storb R., Appelbaum F.R. 2001. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *The New England Journal Medicine*, 344, 3: 175-181

Bergauer A., Dajčman D. 2006. Osnove jetrne ciroze. *Medicinski mesečnik*, 2: 14-22

Broxmeyer H.E. 2010. Cord blood hematopoietic stem cell transplantation, StemBook (ed.). The Stem Cell Research Community.
<http://www.stembook.org/node/693> (14.2.2010)

Bruserud O., Tjønnfjord G., Gjertsen B.T., Foss B., Ernst P. 2000. New strategies in the treatment of acute myelogenous leukemia: mobilization and transplantation of autologous peripheral blood stem cells in adult patients. *Stem Cells*, 18, 5: 343-351

Cao FJ, Feng SQ. 2009. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and the treatment of spinal cord injury. *Chinese Medical Journal*, 122, 2: 225-231

Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J.L., Bousso P., Deist F.L., Fischer A. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288, 5466: 669-672

Cell counting slides. 2010. Cell vision.
<http://www.cellvision.nl/> (5.6.2010)

Lympholyte®-H. 2010. Cedarlane. Data sheet: 2 str.

ClinicalTrials.gov. 2011. A service of the U.S. National Institutes of Health
<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=stem+cells&map=EU> (5.5.2011)

Chamber slide. 1997. Technische Universität Wien.
<http://www.martin-mandl.com/da/cs.htm> (23.9.2010)

Choumerianou D.M., Dimitriou H., Kalmanti M. 2008. Stem cells: promises versus limitations. *Tissue Engineering*, 14, 1: 53-60

Darovanje popkovnične krvi. 2010. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino.
http://www.ztm.si/sl/register_darovalcev_kmc/darovanje_popkovnicne_krvi/ (6.6. 2010)

D'Ippolito G., Diabira S., Howard G. A., Menei P., Roos B. A. and Schiller P. C. 2004. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *Journal of cell science*, 117, 14: 2971-2981

Diseases treated by blood stem cells. 2011. USA, Parents guide to cord blood fundation.
[\(6.62010\)](http://parentsguidecordblood.org/content/usa/medical/diseases.shtml?navid=35#trial)

Domanović D. 2007. Zgodovina presajanja krvotvornih matičnih celic v Sloveniji in v svetu. V: Pridobivanje krvotvornih matičnih celic - zdravljenje in zdravstvena nega bolnika ob presaditvi KMC. Zreče, 25. in 26. maj 2007. Nunar Perko A. (ur.). Ljubljana, Zbornica zdravstvene in babiške nege Slovenije-Zveza društev medicinskih sester, babic in zdravstvenih tehnikov Slovenije, Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji: 15-21

Domanović D. 2004. Zbiranje in predelava krvotvornih matičnih celic iz placentne krvi. V: Zdravljenje s krvjo, transfuzijska medicina v porodništvu. Portorož, 3-4 december 2004. Bricl I., Lamprecht N. (ur.). Ljubljana, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Klinični center Ljubljana, Evropsa šola za transfuzijsko medicino: 113-114

Domen J., Wagers A., Weissman I. L. 2006. Bone marrow (hematopoietic) stem cells. Regenerative Medicine. National Institutes of Health, Department of Health and Human Services.
[\(15.3.2010\)](http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter5.asp#figure1)

Erices A., Conget P., Minguell J. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. British journal of haematology, 109, 1: 235-242

Ford CE, Hamerton JL, Barnes DWH, Loutit JF. 1956. Cytological identification of radiation chimeras. Nature, 177, 4506: 452-454

Friedenstein A.J., Deriglasova U.F., Kulagina N.N., Panasuk A.F., Rudakowa S.F., Luria E.A., Ruadkow I.A.. 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Experimental hematology, 2, 2: 83-92

Fritsch G., Stimpfl M., Kurz M., Printz D., Buchinger P., Fischmeister G., Hoecker P., Gadner H. 1996. The composition of CD34 subpopulations differs between bone marrow, blood and cord blood. Bone marrow transplantation, 17, 2: 169-718

Gluckman E., Broxmeyer H.E., Auerbach A.D., Friedman H.S., Douglas G.W., Devergie A., Wperou H., Thierry D., Socie G., Lehn P. 1989. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from HLA identical sibling. The New England Journal of Medicine, 321, 17: 1174-1178

Gluckman E. 2009. History of cord blood transplantation. Bone marrow transplantation, 44, 10: 621-626

Gordon M., Habib N. 2005. Stem Cells. World Intellectual Property Organisation WO 2005/059113 A1.

Gordon M.Y., Levicar N., Pai M., Bachellier P., Dimarakis I., Al-Allaf F., M'Hamdi H., Thalji T., Welsh J.P., Marley S.B., Davies J., Dazzi F., Marelli-Berg F., Tait P., Playford R., Jiao L., Jensen S., Nicholls J.P., Ayav A., Nohandani M., Farzaneh F., Gaken J., Dodge R., Alison M., Apperley J.F., Lechler R., Habib N.A. 2006. Characterisation and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells*, 24, 7: 1822–1830

Gordon M.Y. 2008. Stem cells for regenerative medicine-biological attributes and clinical application. *Experimental hematology*, 36, 6: 726-732

Gorin N.C., Labopin M., Pichard P., Sierra J., Fiere D., Rio B., Meloni G., Sanz M.A., Iriondo A., Fouillard L., Frassoni F. 2000. Feasibility and recent improvement of autologous stem cell transplantation for acute myelocytic leukaemia in patients over 60 years of age: importance of the source of stem cells. *British journal of haematology*, 110, 4: 887-93

Goodwin H.S., Bicknese A.R., Chien S.N., Boqucki C.O., Wall D.A. 2001. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biology blood marrow transplantation*, 7, 11: 581-588

Gürman G., Celebi H., Ustün C., Arat M., İlhan O., Ozcan M., Arslan O., Uysal A., Akan H., Beksaç M., Konuk N., Koç H. 2001. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for severe aplastic anemia. *Ther apher dial*, 5, 1: 54-57

Hao Q.L., Shah A.J., Thiemann F.T., Smogorzewska E.M., Crooks G.M. 1995. A functional comparison of CD34+ and CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood*, 86, 10: 3745-3753

Hao Q.L., Zhu J., Price M.A., Payne K.J., Barsky L.W., Crooks G.M. 2001. Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood*, 97, 12: 3683-90

Herberts C.A., Kwa M., Hermsen H. 2011. Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of Translational Medicine*, 9: 29

Higuchi A., Yang S.T., Li P.T., Tamai M., Tagawa Y., Chang Y., Chang Y., Ling Q.D., Hsu S.T. 2010. Direct ex vivo expansion of hematopoietic stem cells from umbilical cord blood on membranes. *Journal of Membrane Science*, 351, 1-2: 104-111

Hiyama E., Hiyama K. 2007. Telomere and telomerase in stem cell. *British Journal of Cancer*, 96, 7: 1020-1024

Human Embryonic Stem Cells: A Decade of Discovery, Controversy and Potential
<http://www.allthingsstemcell.com/tag/clinical-trials/> (14.8.2010)

Dynal® CD34 Progenitor Cell Selection System. 2007. Norway, Invitrogen: 2 str.

Magnets for Molecular and Cell Separation Applications. 2010. Norway, Invitrogen.
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Dynal/Magnets.html> (6.5.2010)

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

Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 6893: 41–49

Jin S.W., Patterson C. 2009. The Opening Act: Vasculogenesis and the Origins of Circulation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 29; 5: 623-629

Kakinuma S., Tanaka Y., Chinzei R., Watanabe M., Shimizu-Saito K., Hara Y., Teramoto K., Arii S., Sato C., Takase K., Yasumizu T., Teraoka H. 2003. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells*, 21, 2: 217-227

Karsunky H., Inlay M.A., Serwold T., Bhattacharya D., Weissman I.L. 2008. Flk2⁺ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood*, 111, 12: 5562 – 5570

Kekarainen T., Mannelin S., Laine J., Jaatinen T. 2006. Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells. *BMC Cell Biology*, 7: 30

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, 5: 1294-1301

Kestendjeva S., Kyurkchiev D., Tsvetkova G., Mehandijev T., Dimitrov A., Nikolov A., Kyurkchiev S. 2008. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biology International*, 32, 7: 724-732

Kim J. W., Kim S. Y., Park S. Y., Kim Y. M., Kim J. M., Lee M. H., Ryu H. M. 2004. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Annals of Hematology*, 83, 12: 733–738

Knoblich J.A. 2008. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*, 132, 4: 583-597

Knudtzon S. 1974. In vitro growth of granulocyte colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood*, 43, 3: 357-361

Kondo M., Wagers A.J., Manz M.G., Prohaska S.S., Scherer D.C., Beilhack G.F., Shizuru J.A., Weissman I.L.. 2003. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annual Review Immunology*, 21: 759-806

- Kook H., Kim G.M., Kim H.J., Kim C.J., Yoon W.S., Hwang T.J. 2000. Rubella-associated aplastic anemia treated by syngeneic stem cell transplantations. *American Journal of Hematology*, 64, 4: 303-305
- Kucia M., Reca R., Campbell F. R., Zuba-Surma E., Majka M., Ratajczak J. and Ratajczak M. Z. 2006. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4⁺ SSEA-1⁺ Oct-4⁺ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, 20, 5: 857–869
- Kucia M., Zuba-Surma E.K., Wysoczynski M., Wu W., Ratajczak J., Machalinski B., Ratajczak M.Z. 2007a. Adul marrow-derived very small embryonic-like stem cells and tissue engineering. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7, 10: 1499-1514
- Kucia M.J., Wysoczynski M., Wu W., Zuba-Surma E.K., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2008. Evidence That Very Small Embryonic-Like Stem Cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells*, 26, 8: 2083-2092
- Kucia M., Wu W., Ratajczak M.Z. 2007b. Bone marrow-derived very small embryonic-like stem cellc: Their developmental origin and biological significance. *Developmental Dynamics*, 236, 12: 3309-3320
- Kurtzberg J., Laughlin M., Graham M.L., Smith C., Olson J.F., Halperin E.C., Ciocci G., Stevens C.E., Rubinstein P. 1996. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *New England Journal of Medicine*, 335, 3: 157–166
- Lang P., Bader P., Schumm M., Feuchtinger T., Einsele H., Fuhrer M., Weinstock C., Handgretinger R., Kuci S., Martin D., Niethammer D., Greil J. 2004. Transplantation of a combination of CD133+ and CD34+ selected cells from alternative donors. *British Journal of Haematology*, 124, 1 :72-79
- Laporte J.P., Gorin N.C., Rubinstein P., Lesage S., Portnoi M.F., Barbu V., Lopez M., Douay L., Najman A. 1996. Cord blood transplantation from an unrelated donor in an adult with chronic myelogenous leukemia. *New England Journal Medicine*, 335, 3: 167–170
- Laughlin M.J., Barker J., Bambach B., Koc O.N., Rizzieri D.A., Wagner J.E., Gerson S.L., Lazarus H.M., Cairo M., Stevens C.E., Rubinstein P., Kurtzberg J. 2001. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *New England Journal Medicine*, 344, 24: 1815-1822
- Leary A.G., Ogawa M. 1987. Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. *Blood*, 69, 3: 953-956
- Lee O.K., Kuo T.K., Chen W.M., Lee K.D., Hsieh S.L., Chen T.H. 2004. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103, 5: 1669-1675

- Levicar N., Pai M., Habib N.A., Tait P., Jiao L.R., Marley S.B., Davis J., Dazzi F., Smadja C., Jensen S.L., Nicholls J.P., Apperley J.F., Gordon M.Y. 2008. Long-term clinical results of autologous infusion of mobilized adult bone marrow derived CD34+ cells in patients with chronic liver disease. *Cell Proliferation*, 41, 1: 115-125
- Levičar N., Dimarakis I., Flores C., Tracey J., Gordon M.Y., Habib N.A. 2007. Stem cells as a treatment for chronic liver disease and diabetes. *Handbook of experimental pharmacology*, 180: 243-262
- Loges S., Fehse B., Brockmann M.A., Lamszus K., Butzal M., Guckenbiehl M., Schuh G., Erqun S., Fischer U., Zander A.R., Hossfeld D.K., Fiedler W., Gehling U.M. 2004. Identification of the adult human hemangioblast. *Stem cells and development*, 13, 3: 229-42
- Lorenz E., Uphoff E.D., Reid T.R., Shelton E. 1951. Modification of acute irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injection. *Radiology*, 58: 863-877
- Luzar B., Gale N., Poljak M., Cör A. 2000. Telomere in telomeraza pri človeku – zgradba, funkcija in vloga v procesu kancerogeneze. *Medicinski razgledi*, 39, 3: 271-279
- Malovrh P. Izvorne celice - zdravilo prihodnosti? 2005. Kvarkadabra.
http://www.kvarkadabra.net/images/articles/zarodne-celice_2_original.gif (20.3.2010)
- Mayani H., Lansdorp P.M. 1998. Biology of Human Umbilical Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Stem cells*, 16, 3: 153-165
- Marco F., Bureo E., Ortega J.J., Badell I., Verdaguer A., Martínez A., Muñoz A., Madero L., Olivé T., Cubells J., Castel V., Sastre A., Maldonado M.S., Díaz M.A. 2000. High survival rate in infant acute leukemia treated with early high-dose chemotherapy and stem-cell support. Grupo Español de Trasplante de Médula Osea en Niños. *Journal of clinical oncology*, 18, 18: 3256-3261
- Martin-Rendon E., Watt S.W. 2003. Stem cell plasticity. *British Journal of Haematology*, 122, 6: 877-891
- Mayani H., Lansdorp P.M. 1998. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells*, 16, 3: 153-165
- McGuckin C.P., Forraz N., Baradez M.O., Navran S., Zhao J., Urban R., Tilton R., Denner L. 2005. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell proliferation*, 38, 4: 245-255
- McGuckin C.P., Forraz N., Baradez M.O., Basford C., Dickinson A.M., Navran S., Hartgerink J.D. 2006. Embryonic-like stem cells from umbilical cord blood and potential for neural modeling. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 66, 4: 321-329

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

Melnik K., Nakamura M., Comella K., Lasky L.C., Zborowski M., Chalmers J.J. 2001. Evaluation of eluents from separation of CD34+ cells from human cord blood using a commercial, immunomagnetic cell separation system. Biotechnology Progress, 17, 5: 907-916

Indirect CD34 MicroBead Kit. 2010. USA, Miltenyi Biotech: 3 str.

MACS Technology, Gold standard in cell separation. 2008. USA, Miltenyi Biotech.
http://www.miltenyibiotec.com/download/flyer_en/680/MACS_Technology_Flyer.pdf
(6.5.2010)

Minn K.T., Najem M.S. 2011. Umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation, an alternative to bone marrow.
http://www.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project-030111-215533/unrestricted/IQP_Kyaw_Thu_Minn_and_Mortada_Salman_Najem.pdf

Mohamadnejad M., Namiri M., Bagheri M., Hashemi S. M., Ghanaati H., Zare Mehrjardi N., Kazemi Ashtiani S., Malekzadeh R., Baharvand H. 2007. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. World Journal Gastroenterology, 13, 24: 3359-3363

Musina R.A., Bekchanova E.S., Belyavskii A.V., Grinenko T.S., Sukhikh G.T. 2007. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells. Bulletin experimental biology and medicine, 143, 1: 127-131

Nakahata T., Ogawa M. 1982. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. The journal of clinical investigation, 70, 6: 1324-1328

Netterwald J. 2008. To Purify or Not to Purify. Drug Discovery & Development.
www.dddmag.com/article-RNA-purification.aspx (10.4.2010)

Ohnuma K., Isoyama K., Ikuta K., Toyoda Y., Nakamura J., Nakajima F., Tsuchida M., Ohira M., Suminoe A., Hara T., Nishihira H. 2001. Cord blood transplantation from HLA-mismatched unrelated donors as a treatment for children with haematological malignancies. British Journal Haematology, 112, 4: 981-987

Orkin S.H., and Zon L.I. 2008. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. Cell, 132, 4: 631–644

Pai M., Zacharoulis D., Milicevic M.N., Helmy S., Jiao L.R., Levicar N., Tait P., Scott M., Marley S.B., Jestice K., Glibetic M., Bansi D., Khan S.A., Kyriakou D., Rountas C., Thillainayagam A., Nicholls J.P., Jensen S., Apperley J.F., Gordon M.Y., Habib N.A.

2008. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34+ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. *The American Journal of Gastroenterology*, 103, 8: 1952-1958
- Papayannopoulou T. 1999. Hematopoietic stem/progenitor cell mobilization: A continuing quest for etiologic mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 872: 187-197
- Pattinson D.S., Caulfield T. 2004. Variations and voids: the regulation of human cloning around the world. *BMC Medical Ethics*, 5: E9
- Piechev M., Naiyer A. J., Pereira D., Zhu Z., Lane W. J., Williams M., Oz M.C., Hicklin D.J., Witte L., Moore M.A.S., Rafii S. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 95, 3: 952-958
- Pretnar J. 2007. Krvotvorne matične celice - pridobivanje, uporaba in posebnosti bolnikov po presaditvi. V: Pridobivanje krvotvornih matičnih celic - zdravljenje in zdravstvena nega bolnika ob presaditvi KMC. Zreče, 25. in 26. maj 2007. Nunar Perko A. (ur.). Ljubljana, Zbornica zdravstvene in babiške nege Slovenije-Zveza društev medicinskih sester, babic in zdravstvenih tehnikov Slovenije, Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji: 22-25
- Pretnar J., Zver S., Andoljšek D., Černelč P., Podgornik H., Pajič T., Mlakar U., Modic M., Preložnik Zupan I. 2005. Kostni mozeg in matične krvne celice. Bolezni krvi in krvotvornih organov, V: Interna medicina. Kocijančič A., Mrevlje F., Štajer D. (ur.). 3. izdaja, Ljubljana, Littera picta: 1172-73, 1183-84, 1191, 1284
- Pretnar J. 2004. Petnajst let presajanja krvotvornih matičnih celic v Sloveniji. *Zdravniški vestnik*, 73: 1- 4
- Rahman M. 2006. Introduction to flow cytometry. Oxford Serotec.
<http://www.ab-direct.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf> (13.8.2010)
- Ratajczak M.Z., Machalinski B., Wojakowski W., Ratajczak J., Kucia M. 2007a. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4⁺ stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia*, 21 ,5: 860-867
- Reyes M., Dudek A., Jahagirdar B., Koodie L., Marker P.H., Verfaillie C.M. 2002. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *Journal of Clinical Investigation*, 109, 3: 337-346
- Ribatti D. 2007. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. *Leukemia Research*, 31, 4: 439-444
- Rocha V., Crotta A., Ruggeri A., Purtill D., Boudjedir K., Herr A., Ionescu I., Gluckman E., Eurocord Registry. 2010. Double cord blood transplantation: Extending the use of

unrelated umbilical cord blood cells for patients with hematological diseases. Best practice and research: Clinical Hematology, 23, 2: 223-229

Rocha V., Gluckman E., Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Group. 2006. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. Biology of blood and marrow transplantation, 12, 1: 34-41

Rocky S.T., Genevieve B., Tuli R. 2003. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Arthritis Research Therapy, 5, 1: 32-45

Romanov Y.A., Svintsitskaya V.A., Smirnov V.N. 2003. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells, 21, 1: 105-110

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 (23.4.2010)

Rubinstein P. 2006. Why Cord Blood? Human Immunology 67, 6: 398-404

Salama H., Zekri A.R., Zern M., Bahnassy A., Loutfy S., Shalaby S., Vigen C., Burke W., Mostafa M., Medhat E., Alfi O., Huttinger E. 2010. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in 48 patients with end-stage chronic liver diseases. Cell Transplantation, 19, 11: 1475-1486

Schatteman GC, Awad O. 2004. Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors. Anat Rec 276A: 13–21.

Schwartz R.E., Reyes M., Koodie L., Jiang Y., Blackstad M., Lund T., Lenvik T., Johnson S., Hu W.S., Verfaillie C.M. 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. The journal of clinical investigation, 109, 10: 1291-1302

Shin J.W., Lee D.W., Kim M.J., Song K.S., Kim H.S., Kim H.O. 2005. Isolation of Endothelial Progenitor Cells from Cord Blood and Induction of Differentiation by Ex Vivo Expansion. Yonsei Medical Journal, 46, 2: 260–267

Smith S., Neaves W., Teitelbaum S. 2006. Adult Stem Cell Treatments for Diseases? Science Express.
<http://www.sciencemag.org/content/suppl/2006/07/27/1129987.DC1/Smith.SOM.V2.pdf> (13.6.2010)

Sohni A., Verfaillie C.M. 2011. Multipotent adult progenitor cells. Best practise and Research Clinical Haematology, 24, 1: 3-11

Stem cells: scientific and future research directions. 2002. Kirschstein R., Skirboll L.R. (ur.). Bethesda, Maryland, ZDA, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services: 106

Strbad M. 2004. Osamitev in opredelitev človeških matičnih celic iz kostnega mozga, diplomsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, biotehniška fakulteta, str. 7

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

Surbek D.V., Visca E., Steinmann C., Tichelli A., Schatt S., Hahn S., Gratwohl A., Holzgreve W. 2000. Umbilical cord blood collection before placental delivery during cesarean delivery increases cord blood volume and nucleated cell number available for transplantation. *American journal of obstetrics and gynecology*, 183, 1: 218-221

Tada J., Omine M., Suda T., Yamaguchi N. 1999. A common signaling pathway via Syk and Lyn tyrosine kinases generated from capping of the sialomucins CD34 and CD43 in immature hematopoietic cells. *Blood*, 93, 11: 3723-3735

Tan P.H., Hwang W.Y., Goh Y.T., Tan P.L., Koh L.P., Tan C.H., Quah T.C. 2004. Unrelated peripheral blood and cord blood hematopoietic stem cell transplants for thalassemia major. *American journal hematology*, 75, 4: 209-212

Tocci A., Forte L. 2003. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *The Hematology Journal*, 4, 2: 92-96

Till J.E., McCullough E.A. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research*, 14: 213-222

Verfaillie C. 2005. Stem cell plasticity. *Hematology*, 10, 1: 293-296

Vesole D.H., Crowley J.J., Chatourian R., Stiff P.J., Johnson D.B., Cromer J., Salmon S.E., Barlogie B. 1999. High-dose melphalan with autotransplantation for refractory multiple myeloma: results of a Southwest Oncology Group phase II trial. *Journal of clinical oncology*, 17, 7: 2173-2179

Wadlow R.C., Porter D.L. 2002. Umbilical cord blood transplantation: Where do we stand? *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 8, 12: 637-647

Wagner J.E. 1994. Umbilical cord blood transplantation: overview of the clinical experience. *Blood Cells*, 20, 2-3: 227-33

Wang H.S., Hung S.C., Peng S.T., Huang C.C., Wei H.M., Fu Y.S., Lai M.C., Chen C.C. 2004. Mesenchymal stem cells in the Whartons jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 22, 7: 1330-1337

Wong A., Yuen P.M.P., Li K., Yu A.L., Tsoi W.C. 2001. Cord blood collection before and after placental delivery: levels of nucleated cells, haematopoietic cells, leukocyte subpopulations and macroscopic clots. *Bone Marrow Transplant*, 27, 2: 133–138

Weissman I. L. Bone marrow (hematopoietic) stem cells. *Regenerative Medicine*. 2006.
National Institutes of Health, Department of Health and Human Services (6.4,2009)
<http://stemcells.nih.gov/info/2006report/2006Chapter2.htm> (15.3.2010)

Weissman I., Traver D.J., Akashi K. 2001. Mammalian myeloid progenitor cell subsets.
World Intellectual Property Organisation WO 01/00019

Wexler S.A., Donaldson C., Denning-Kendall P., Rice C., Bradley B., Hows J.M. 2003.
Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal ‘stem’ cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal Haematology*, 121, 2: 368-374

Xiong J.W. 2008. Molecular and Developmental Biology of the Hemangioblast.
Developmental dynamics, 237, 5: 1218–1231

Yu H., Fang D., Kumar S.M., Li L., Nguyen T.K., Acs G., Herlyn M., Xu X. 2006.
Isolation of a Novel Population of Multipotent Adult Stem Cells from Human Hair Follicles. *American Journal of Pathology*, 168, 6: 1879-1888

Zhao Y., Mazzone T. 2009. Isolated Embryonic-Like Stem Cells Derived From Human Umbilical Cord Blood. United States Patent Application US 2009/0175832.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Miomirju Kneževiču, ker me je podrobnejše seznanil s področjem regenerativne medicine in ponudil možnost opravljanja diplomskega dela na Zavodu RS za transfuzijsko medicino.

Zahvaljujem se somentorici dr. Elviri Maličev, ki me je seznanila z delom na pretočnem citometru in si je vedno bila pripravljena vzeti čas za reševanje problemov glede eksperimentalnega dela. Prav tako se ji zahvaljujem za potrežljivost, spodbude, zaupanje, nasvete pri izdelavi ter za strokovni pregled diplomske naloge.

Zahvala gre tudi recenzentki doc. dr. Tanji Kunej za strokovni pregled naloge.

Zahvaljujem se tudi Urški Tajnšek, Mojci Jež in Matiji Vebru, ki so me uvedli v delo v celičnem laboratoriju in za vse nasvete in spodbude pri opravljanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi Zavodu RS za transfuzijsko medicino, ki mi je finančno omogočil izvedbo raziskave.

Zahvala gre tudi izr. Prof. dr. Primožu Rožmanu, ker mi je omogočil izvedbo raziskave.

Iskreno se zahvaljujem vsem, ki ste mi kakorkoli pomagali pri nastajanju tega dela, ter hvala vsem, ki ste kadarkoli verjeli vame in tistim, ki ste mi dali priložnost.

Najlepša hvala tudi moji družini in fantu, ker so verjeli vame, me spodbujali in mi vedno stali ob strani.

PRILOGE

Priloga A: Izjava o poučenosti in privolitev za darovanje popkovnične krvi



IZJAVA O POUČENOSTI IN PRIVOLITEV ZA DAROVANJE POPKOVNIČNE KRVI

Spodaj podpisana _____

rojena _____

prostovoljno izjavljam;

1. da sem prejela, prebrala in razumela informacije o:

- terapevtskem namenu in potrebi za darovanje popkovnične krvi,
- odvzem popkovnične krvi,
- boleznih, ki se lahko prenesejo pri zdravljenju s popkovnično krvjo
- posledicah in tveganju, povezanih z darovanjem,
- varovanju osebnih podatkov,
- potrebnih preiskavah in predvidenih postopkih pred odvzemom,
- zdravljenju s tkivi / celicami,
- preiskavah in predvidenih postopkih po odvzem,
- pravicah iz naslova zdravstvenega zavarovanja;

2. da sem bila seznanjena z možnostjo:

- da lahko kadar koli brez posledic odstopim od darovanja popkovnične krvi,
- seznanitve z rezultati testiranj z razlagom;

3. da sem imel/a možnost zastaviti vprašanja;

4. da so vsi podatki, ki sem jih navedel/a, resnični;

In soglašam:

- da se v porodnišnici odvzame popkovnična kri po rojstvu mojega otroka in shrani v Enoti za shranjevanje popkovnične krvi (ESPOK) na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana, ter uporabi za zdravljenje bolnikov v skladu z veljavno zakonodajo;
- da mi v času ob rojstvu otroka v porodnišnici odvzamejo vzorec krvi (3 x 6 ml) za biološke preiskave;
- da se z darovano popkovnično krvjo in mojo krvjo opravijo potrebeni predpisani testi in da se me o morebitnih pozitivnih izsledkih zaupno obvesti;
- da porodnišnica posreduje moje osebne podatke, podatke o novorojencu ter podatke o porodu Zavodu RS za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana ter da se moji in otrokovi osebni podatki obdelujejo izključno za namene darovanja in zdravljenja skladno z zakonom.

Strinjam, da se odvzeta popkovnična kri, ki ne bo primerna za zdravljenje, lahko uporabi za medicinske raziskave, ki so odobrene s strani Komisije za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje. **(Obkrožite) DA NE**

Datum: _____ Podpis: _____

Ime in priimek priče (partner, sorodnik, prijatelj): _____ Podpis priče: _____

V nadaljevanju postopka Vas bomo pisno obvestili ali izpolnjujete pogoje za odvzem in shranjevanje popkovnične krvi ter Vam posredovali navodila za prevzem paketa za odvzem popkovnične krvi.

Če imate kakršnakoli vprašanja, pokličite na telefonsko številko 01 5438100 int. 314 Enota za shranjevanje popkovnične krvi na Zavodu RS za transfuzijsko medicino ali na elektronski naslov espok-ztm@ztm.si

Priloga B: Izjava o poučenosti in privolitev za darovanje kostnega mozga

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

Zavod RS za transfuzijsko medicino
Šlajmerjeva 6
SI-1000 Ljubljana

IZJAVA O POUČENOSTI IN PISNA PRIVOLITEV V POSTOPEK

Podpisani/-a

rojen/-a

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

Dr. me je seznanil/-a s postopki odvzema vzorca, hkrati pa tudi odgovarja za mojo varnost pri tem dejanju.

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

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

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

Datum:

Podpis preiskovanca/-ke: