

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urška TAJNŠEK

**UPORABA MATIČNIH CELIC IZ MAŠČOBNEGA
TKIVA KOT HRANILNE PLASTI ZA GOJENJE
EMBRIONALNIH MATIČNIH CELIC**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urška TAJNŠEK

**UPORABA MATIČNIH CELIC IZ MAŠČOBNEGA TKIVA KOT
HRANILNE PLASTI ZA GOJENJE EMBRIONALNIH MATIČNIH
CELIC**

DIPLOMSKO DELO
univerzitetni študij

**ADIPOSE DERIVED STEM CELLS AS A FEEDER LAYER FOR
EMBRYONIC STEM CELLS**

GRADUATION THESIS
university studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v laboratoriju za matične celice in tkivno inženirstvo (»Laboratory for Stem Cells and Tissue Engineering«) na Univerzi Columbia (»Columbia University«) v New Yorku, ZDA, v sodelovanju z Zavodom RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 19. 05. 2009 za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miomirja Kneževiča, za somentorico dr. Darjo Marolt in za recenzenta prof. dr. Petra Dovča.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Član: dr. Darja MAROLT, univ. dipl. mikrobiol.
Columbia University, Laboratory for Stem Cells and Tissue Engineering,
NY, ZDA

Član: prof. dr. Peter DOVČ
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.

Urška TAJNŠEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 606 : 61 (043.2)
KG	Matične celice/maščobno tkivo/hranilne plasti/embrionalne matične celice/mezenhimske matične celice/kostni mozeg
AV	TAJNŠEK, Urška
SA	KNEŽEVIČ, Miomir (mentor)/MAROLT, Darja (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2009
IN	UPORABA MATIČNIH CELIC IZ MAŠČOBNEGA TKIVA KOT HRANILNE PLASTI ZA GOJENJE EMBRIONALNIH MATIČNIH CELIC
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XVIII, [1] str., 21 pregl., 36 sl., 120 vir.
IJ	Sl
JI	sl / en
AI	<p>Pri postopkih gojenja nediferenciranih EMC in indukciji njihove diferenciacije <i>in vitro</i> je pomembno, poleg ustrezne sestave gojišč, zagotavljati tudi primeren substrat za pritrjanje kolonij EMC. Hranilna plast je plast celic, običajno MEF, ki se jo nasadi v gojilne posode, nanje pa se nato nasadi EMC. Celice hranilne plasti izločajo takšne ekstracellularne proteine, ki omogočajo pritrjanje EMC ter regulatorne molekule, ki so pomembne za vzdrževanje nediferenciranega stanja EMC. Raziskave gojenja hEMC so usmerjene v iskanje primernih hranilnih plasti humanega izvora. Več celičnih tipov se je že izkazalo za uspešne (hEMC so ohranile podobne značilnosti kot hEMC gojene na MEF, izražale so površinske označevalce SSEA-4, Tra-1-60 in Tra-1-81 (in niso izražale SSEA-1), transkripcijske dejavnike Oct-4, Sox-2 in Nanog, encime alkalna fosfataza in telomeraza ter so ohranile diferenciacijski potencial, ko so jih gojili v embrioidnih telescih ali jih presadili, da so tvorile teratome v ksenotransplantatih). Naše delo je bilo usmerjeno v raziskovanje možnosti uporabe ASC iz maščobnega tkiva kot hranilne plasti za rast hEMC. ASC so podobne MMC iz kostnega mozga, ki so že bile uporabljene za hranilne plasti. Začetni rezultati so obetavni, saj je pri hEMC gojenih na ASC nediferenciran fenotip močno izražen. Izraženi so vsi označevalci nediferenciranega stanja, ki smo jih preizkušali (SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81) ter transkripcijski dejavniki Oct-4, Sox-2 in Nanog (slednji je celo malo povečan). Izražen pa je tudi SSEA-1, ki je označevalec diferenciacije in ga nediferencirane hEMC ne izražajo, ter gena Brachyury in Sox-17, ki prav tako nakazujeta diferenciacijo. Izražanje genov bo potrebno preizkusiti še na proteinском nivoju. Opazili smo spremembe v hitrosti rasti in morfologiji ASC ter MMC v različnih gojiščih. V gojišču za hEMC celice postanejo ožje, pri ASC se pojavijo tudi stresna vlakna. Komponente ECM (laminin, fibronektin) so prisotne v gojiščih za hEMC in MEF, kolagen I pa se ob menjavi v gojišče za hEMC sprosti iz celic. Ob menjavi gojišča se poveča tudi podvojevalni čas. Predvidevamo, da je ključna komponenta, ki povzroči spremembo, bFGF in priporočamo nadaljnje raziskave v tej smeri.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DD UDC 606 : 61 (043.2)
CX Stem cells/adipose tissue/feede layer/embryonic stem cells/mesenchimal stem cells/bone marrow
AU TAJNŠEK, Urška
AA KNEŽEVIČ, Miomir (supervisor)/MAROLT, Darja (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study Programme of Biotechnology
PY 2009
TI ADIPOSE DERIVED STEM CELLS AS A FEEDER LAYER FOR EMBRYONIC STEM CELLS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XVIII, 68, [1] p., 18 tab., 36 fig., 120 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Culture of undifferentiated ESC and induction of differentiation require control of culture medium composition and the use of an appropriate substrate for cell attachment. For this purpose, mouse embryonic fibroblasts are usually seeded into culture dishes, and used as feeder layer. Feeder cells synthesize extracellular matrix proteins that enable ESC attachment, as well as regulatory molecules involved in maintenance of undifferentiated ESC state. Studies have been focusing on search of appropriate feeder layer cells of human origin. Several cell types have been shown to support growth undifferentiated hESC, with characteristics similar to hESC cultured on MEF (expression of surface markers SSEA-4, Tra-1-60 and Tra-1-81 (absence of SSEA-1), transcription factors Oct-4, Sox-2, Nanog, enzymes alkaline phosphatase and telomerase, as well as potential for differentiation when cultured in embryoid bodies and fromation of teratomas after xenotransplantation). Our study was aimed at testing adipose stem cells - ASC as possible feeder cells for hESC. ASC are similar to MSC from the bone marrow, which have previously been used as feeders for hESC. Our initial data is promising, showing strong expression of undifferentiated phenotype markers (SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81) and transcription factors (Oct-4, Sox-2, Nanog - the latter slightly increased in comparison to hESC cultured on MEF). Some SSEA-1 expression was also detected, as well as increased Brachyury and Sox-17 gene expression, indicating induction of cell differentiation. Further studies of differentiation markers on protein level are suggested. Additionally, we have noticed changes in growth rate and morphology of ASC and MSC in different culture media. Cells exhibited narrow elongated morphology in hESC medium compared to MEF medium, and stress fibers were noticed in ASC. Matrix components laminin and fibronectin were detected in both media, and release of collagen I from the cells was noted after the change from MEF to hESC medium. We have noted differences in doubling time in different culture media. Our results indicate the role of bFGF in these changes, suggesting further studies in this direction.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	X
Slovarček	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	3
1.2 HIPOTEZA	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 EMBRIONALNE MATIČNE CELICE	4
2.1.1 Fenotip EMC	6
2.1.2 Sprosobnost diferenciacije EMC	9
2.2 POSTOPKI GOJENJA EMC	11
2.2.1 Sestava gojišča za gojenje EMC	12
2.2.2 Hranilne plasti in substrati za gojenje EMC	12
2.3 ODRASLE MATIČNE CELICE	14
2.4 MATIČNE CELICE IZ MAŠČOBNEGA TKIVA	17
2.4.1 Razvoj in značilnosti maščobnega tkiva	17
2.4.2 Pridobivanje MC iz maščobnega tkiva	20
2.4.3 MC iz maščobnega tkiva kot hranilne celice	21
2.5 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE IZ KOSTNEGA MOZGA	21
2.5.1 Pridobivanje MMC iz kostnega mozga	23
2.5.2 MMC iz kostnega mozga kot hranilne celice	23
2.6 PRIMERJAVA ASC Z MMC IZ KM	24
3 MATERIAL IN METODE	26
3.1 MATERIALI IN APARATURE	26
3.1.1 Materiali	26
3.1.2 Gojišča in ostale raztopine	29
3.1.3 Aparature	30
3.2 POSTOPKI GOJENJA IN SHRANJEVANJA ASC IN MMC CELIC	31
3.2.1 Odmrzovanje celic	31
3.2.2 Menjava gojišča	31
3.2.3 Presajevanje celic	31
3.2.4 Štetje celic pod mikroskopom	32
3.2.5 Zamrzovanje celic	32
3.3 KARAKTERIZACIJA RASTI ASC IN MMC CELIC IN SINTEZE EKSTRACELULARNIH PROTEINOV	32
3.3.1 Ugotavljanje rasti celic v različnih gojiščih	32
3.3.2 XTT test	32
3.3.3 Nasajanje celic za barvanje ekstracelularnega matriksa	34

3.3.4 Ugotavljanje proteinov ekstracelularnega matriksa	34
3.3.5 Opazovanje pobarvanega ekstracelularnega matriksa pod fluorescentnim mikroskopom	35
3.4 RAST EMBRIONALNIH MATIČNIH CELIC NA HRANILNIH PLASTEH ASC	35
3.4.1 Inaktivacija celic z mitomicinom C in priprava hranilnih plasti	35
3.4.2 Nasaditev, gojenje in presajevanje hEMC	36
3.4.3 Barvanje fenotipskih označevalcev hEMC	36
3.4.4 Opazovanje pobarvanega ekstracelularnega matriksa pod fluorescentnim mikroskopom	37
3.4.5 Analize izražanja značilnih genov hEMC in postopki z RNA	38
3.4.6 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) v realnem času	39
4 REZULTATI	41
4.1 RAST IN MORFOLOGIJA ASC IN PRIMERJAVA Z MMC IZ KOSTNEGA MOZGA	41
4.2 PRIMERJAVA EKSTRACELULARNEGA Matriksa PRI MMC IN ASC V MEF GOJIŠČU IN GOJIŠČU hEMC	42
4.3 PRIMERJAVA RASTNIH KRIVULJ BMSC IN ASC V PETIH RAZLIČNIH GOJIŠČIH	44
4.4 PRIMERJAVA RASTI EMBRIONALNIH MATIČNIH CELIC NA MEF IN NA ASC	47
4.5 IZRAŽANJE GENOV V hEMC V DVEH RAZLIČNIH SISTEMIH	49
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	54
5.1 PRIHODNJE DELO	55
6 POVZETEK	57
7 VIRI	58
7.1 CITIRANI VIRI	58
7.2 DRUGI VIRI	68
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev matičnih celic glede na sposobnost diferenciacije.....	1
Preglednica 2: Embrionalni označevalci – transkripcijski dejavniki	8
Preglednica 3: Komponente plastičnosti matičnih celic	10
Preglednica 4: Različni viri hranilnih plasti in njihove značilnosti	14
Preglednica 5: Razlike med hMC odraslega in hEMC	16
Preglednica 6: Diferencijski potencial MC iz maščobe	18
Preglednica 7: Imunofenotip gojenih humanih MC iz maščobe.....	19
Preglednica 8: Primerjava citokinov, ki jih izločajo ASC in MMC iz KM	24
Preglednica 9: Seznam vseh uporabljenih kemikalij	29
Preglednica 10: Gojilne posode	26
Preglednica 11: Sestava uporabljenih gojišč.....	30
Preglednica 12: Ostale raztopine	30
Preglednica 13: Aparature, ki smo jih uporabili pri izvedbi raziskovalnega dela	30
Preglednica 14: Primerjava komponent ekstracelularnega matriksa (ECM) pri MMC in ASC v dveh različnih gojiščih	43
Preglednica 15: Izražanje embrionalnih označevalcev na kolonijah hEMC gojenih na MEF in ASC hranilnih plasteh.....	48
Preglednica 16: Izražanje gena Oct-4	50
Preglednica 17: Izražanje gena Sox-2	50
Preglednica 18: Izražanje gena Nanog.....	50
Preglednica 19: Izražanje gena Brachyury	50
Preglednica 20: Izražanje gena Sox-17.....	50
Preglednica 21: Izražanje gena Pax-6	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Tkiva, kjer se obeta zdravljenje z matičnimi celicami	2
Slika 2: Razvoj predimplantacijske blastociste pri ljudeh	5
Slika 3: Morula 4 dni po oploditvi.....	5
Slika 4: Blastocista 5 dni po oploditvi	5
Slika 5: Reprogramiranje vključuje sekvenčno aktivacijo označevalcev pluripotentnosti in stohastičnih epigenetskih dogodkov	6
Slika 6: Model glavnih regulatornih poti EMC	7
Slika 7: Identifikacija površinskih označevalcev s pomočjo fluorescentnih značk	9
Slika 8: Postopek vzpostavitve linije EMC	11
Slika 9: Postopek pridobivanja MC iz mačobnega tkiva iz lipoaspirata	21
Slika 10: Mezenhimske matične celice v kulturi	22
Slika 11: Shema nasajene plošče za rastno krivuljo s petimi različnimi gojišči.....	32
Slika 12: Shema testa XTT po inkubaciji	33
Slika 13: ASC, 1. pasaža, ~30% konfluentnost	41
Slika 14: ASC, 1. pasaža, ~50% konfluentnost	41
Slika 15: ASC, 1. pasaža, ~70% konfluentnost	41
Slika 16: ASC, 2. pasaža, ~90% konfluentnost	41
Slika 17: ASC, 3. pasaža, ~40% konfluentnost	42
Slika 18: ASC, 3. pasaža, ~50% konfluentnost	42
Slika 19: MMC, 2. pasaža, ~30% konfluentnost	42
Slika 20: MMC, 5. pasaža, ~90% konfluentnost	42
Slika 21: ASC, 1. pasaža, v MEF gojišču, manj konfluentne	45
Slika 22: ASC, 2. pasaža, v MEF gojišču, bolj konfluentne.....	45
Slika 23: MMC, 2. pasaža, v MEF gojišču, manj konfluentne	45
Slika 24: MMC, 5. pasaža, v MEF gojišču, bolj konfluentne.....	45
Slika 25: ASC, 5. pasaža, v hEMC gojišču (nasajeno za hrnilno plast)	45
Slika 26: MMC, 5. pasaža, v hEMC gojišču (nasajeno za hrnilno plast)	45

Slika 27: Rast celic MMC, 3. pasaža, v petih različnih gojiščih	46
Slika 28: Rast celic ASC, 3. pasaža, v petih različnih gojiščih	47
Slika 29: hEMC na MEF hraničnih plasteh.....	47
Slika 30: hEMC a ASC hraničnih plasteh	47
Slika 31: Relativno izražanje gena Oct-4 glede na hišni gen GAPDH.....	51
Slika 32: Relativno izražanje gena Sox-2 glede na hišni gen GAPDH	51
Slika 33: Relativno izražanje gena Nanog glede na hišni gen GAPDH	52
Slika 34: Relativno izražanje gena Brachyury glede na hišni gen GAPDH	52
Slika 35: Relativno izražanje gena Sox-17 glede na hišni gen GAPDH	52
Slika 36: Relativno izražanje gena Pax-6 glede na hišni gen GAPDH.....	53

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFL	Avtogenska hranilna plast (angl. autogeneic feeder layer)
ASC	Matične celice iz maščobnega tkiva (angl. adipose stem cells)
bFGF	Bazični fibroblastni rastni dejavnik (angl. basic fibroblast growth factor)
Celice iPS	Inducirane pluripotentne celice (angl. induced pluripotent stem cells)
CFU-F	Fibroblast kolonijske enote (angl. colony-forming-unit fibroblast)
c-Myc	Gen, ki kodira protein iz družine Myc transkripcijskih dejavnikov
cond	Prilagojeno gojišče (angl. conditioned medium)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbeccovo modificirano gojišče (angl. Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMEM/F12	Dulbeccovo modificirano gojišče: hranilna mešanica F-12 (angl. Dulbecco's modified Eagle's medium: nutrient mixture F-12)
DMSO	Dimetil sulfoksid
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
EGF	Epidermalni rastni dejavnik (angl. epidermal growth factor)
ECM	Ekstracelularni matriks
EMC	Embionalna matična celica (angl. embryonic stem cell)
FACS	Ločevanje fluorescentno označenih celic (angl. cell fluorescence-activated cell sorting)
FBS	Fetusni serum goveda (angl. fetal bovine serum)
Flt-3	FMS podobna tirozinska kinaza 3 (angl. FMS-like tyrosine kinase 3)
GFP	Zeleni fluorescirajoči protein (angl. green fluorescent protein)
G-CSF	Spodbujevalni dejavnik rasti kolonij granulocitov (angl. granulocyte colony-stimulating factor)
GM-CSF	Spodbujevalni dejavnik rasti kolonij granulocitov in makrofagov (angl. granulocyte/macrophage colony-stimulating factor)
h	Humani (pridevnik)
HGF	Hepatocitni rastni dejavnik (angl. hepatocyte growth factor)
HI-serum	Toplotno inaktiviran serum (angl. heat inactivated serum)
HLA	Humani levkocitni antigen (angl. human leukocyte antigen)
HMG-box	Angl. high mobility group box
ICM	Notranja celična masa (angl. inner cell mass)
IL	Interlevkin (angl. interleukin)
IVF	Oploditev <i>in vitro</i> (angl. <i>in vitro</i> fertilization)
Klf	Angl. Krüppel-like factor
KM	Kostni mozeg (angl. bone marrow)

KMC	Krvotvorna matična celica (angl. haematopoietic cell)
KO-DMEM	»Knockout« DMEM (angl. knockout Dulbecco's modified Eagle's edium)
KO-SR	»Knockout« nadomestek seruma (angl. knockout serum replacement)
LIF	Levkemični inhibirajoči dejavnik (angl. leukemia inhibitory factor)
LT-CIC	Angl. long-term culture initiating cell
MC	Matična celica (angl. stem cell)
M-CSF	Spodbujevalni dejavnik rasti kolonij makrofagov (angl. macrophage colony-stimulating factor)
MEF	Mišji embrionalni fibroblast (angl. mouse embryonic fibroblast)
MMC	Mezenhimska matična celica (angl. mesenchymal stem cell)
MNC	Mononuklearna celica (angl. mononuclear cell)
mRNA	Informacijska RNA (angl. messenger RNA)
Oct-4	Oktamer-4 (angl. octamer-binding transcription factor 4)
Pax-6	Angl. paired box gene 6
PBS	Fosfatni pufer (angl. phosphate buffered saline)
PCR	Verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
POL2	RNA polimeraza II (angl. RNA polymerase II)
Rex-1	RNA eksonukleaza 1 (angl. RNA exonuclease 1)
RNA	Ribonukleinska kislina (ribonucleic acid)
RPMI	Angl. Roswell Park Memorial Institute (gojišče je poimenovano po tej ustanovi)
RT-PCR	Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (angl. reverse transcription polymerase chain reaction)
SCF	Angl. stem cell factor
SCID	Huda kombinirana imunska pomanjkljivost (angl. severe combined immunodeficiency disease)
SCNT	Prenos somatskega jedra, kloniranje (angl. somatic cell nuclear transfer)
Sox-2	Angl. SRY-related HMG-box gene 2
Sox-17	Angl. SRY-related HMG-box gene 17
SR	Nadomestek seruma (angl. serum replacement)
SSEA-1	Angl. stage-specific embryonic antigen 1
SSEA-4	Angl. stage-specific embryonic antigen 4
STO	Mišja embrionalna fibroblastna celična linija
SVF	Stromalna vaskularna frakcija (angl. stromal vascular fraction)
TeSR1/ mTeSR1	Definirano gojišče za gojenje EMC
TGFβ1	Transformirajoči rastni dejavnik β1 (angl. transforming growth factor β1)
TNFα	Dejavnik tumorske nekroze α (angl. tumor necrosis factor α)

Tra	Okrajšava za antigene prisotne na EMC
T75	Gojlina posoda s površino 75 cm^2
VEGF	Vaskularni endoteljski rastni dejavnik (angl. vascular endothelial growth factor)
XTT	Tetrazolijeva sol 3'-{1-[(fenilamino)-karbonil]-3,4-tetrazolijev}-bis (4-metoksi-6-nitro) benzensulfonski kisli hidrat

SLOVARČEK

Pojem	Razlaga
Adherentne celice	Celice, ki se pri gojenju pritrdijo na dno gojilne posode.
Alogensko*	Tkivo, celice ali organ drugega osebka iste biološke vrste, ki pa je genetsko različen in zato tudi imunsko neskladen. »Alogenska uporaba« je uporaba tkiv in celic, odvzetih eni osebi in uporabljenih pri drugi osebi.
Avtologno*/avtogensko	Tkivo, celice ali organ, ki jih presadimo istemu osebku, ki jih je daroval. Nanaša se lahko tudi na proteine, če jih presadimo istemu osebku, ki jih je daroval. »Avtologna uporaba« je uporaba tkiv in celic, odvzetih in uporabljenih pri isti osebi.
Apoptoza	Proces, ki poteka v celici, ko ta propade na nadzorovan način.
Biomaterial	Naraven ali sintetični material (npr. kovina ali polimer), ki je primeren za uporabo skupaj z živim tkivom, posebno kot del medicinskega pripomočka (npr. umeten sklep).
Blastocista*	Stopnja embrionalnega razvoja tik pred zaključkom brazdanja, pri človeku je to 4-5 dan po oploditvi, sestavlja jo od 80 – 150 celic. Zunanja plast (trofoblast) obdaja s tekočino napolnjeno votlino (blastocel) in večjo skupino celic zbranih na notranji strani (notranja celična masa ali embrioblast). Notranja celična masa je vir embrionalnih matičnih celic in se razvije v zarodek, trofoblast pa se vgnezdji v steno maternice in tvori placento. Predstopnji blastociste v razvoju zarodka sta morula in blastula, sledi pa ji gastrula.
Blastomera	Celica, ki nastanje z brazdanjem oplojene jajčne celice.
Celična linija*	Definirana celična populacija, ki jo daljše časovno obdobje ohranjamo v kulturi <i>in vitro</i> . Ponavadi pri teh celicah pride do spontane transformacije oz. dediferenciacije v bolj primitivno obliko, kar podaljša življenjsko dobo celic.
Citokini*	Citokini so topni izločki celic, ki omogočajo medcelično komunikacijo, spodbudijo imunski odziv in razmnoževanje celic. Termin citokin se nanaša na heterogeno skupino topnih proteinov in peptidov, ki v nanomolarnih in pikomolarnih koncentracijah delujejo kot humorali regulatorji in v normalnih ali patoloških pogojih regulirajo delovanje tkiv in celic.
Dediferenciacija*	Proces, v katerem se diferencirane somatske celice vrnejo v manj diferencirano, multipotentno stanje.
Diferenciacija*	Proces, v katerem manj specializirana celica pridobi lastnosti bolj specializiranih celic.
Ektoderm*	Ena izmed treh zarodnih plasti, ki se med drugim razvije v živčni sistem in kožo.
Embrioidno telesce*	Okrogel skupek celic, ki nastane iz embrionalne matične celice, če jo gojimo v suspenzijski kulturi. Embrioidna telesca vsebujejo celice vseh treh zarodnih plasti. Embrioidna telesca ne nastajajo pri normalnem razvoju, ampak se razvijejo samo v pogojih <i>in vitro</i> .

Embrionalna karcionomska celica*	Pluripotentne maligno sprememnjene celice, ki jih vsebujejo teratokarcinomi.
Embrionalna matična celica*	Pluripotentne matične celice, ki jih najdemo v zgodnjem zarodku – blastocisti (~5. dan) in jih lahko izoliramo iz notranje celične mase, preden ta začne tvoriti klične plasti.
Endoderm*	Ena izmed treh zarodnih plasti, ki se med drugim razvije v prebavni sistem.
<i>Ex vivo</i> *	Zunaj živega organizma, velikokrat pomeni isto kot <i>in vitro</i> .
FACS	Ločevanje fluorescentno označenih celic. Angl. cell fluorescence-activated cell sorting.
Fibroblastne celice	Celice s fibroblastno (razraščeno) obliko. Fibroblastna celica sintetizira ekstracelularni matriks, strukturno mrežo za živalsko tkivo. Najbolj pogoste so v vezivnem tkivu. Lahko nastanejo iz matičnih celic ob dodatku ustreznih rastnih dejavnikov.
Histokompatibilnostni antigeni	Antigeni oz. označevalci, ki se nahajajo na površini celic in so pomembni za ujemanje tkiv med darovalcem in prejemnikom. V primeru neujemanja pride do zavrnitve presadka.
Hišni gen	Konstitutivni gen, ki se prepisuje v relativno konstantnih nivojih v mnogih ali vseh znanih pogojih. Njegovi produkti so pomemni za vzdrževanje celice. Predvideva se, da eksperimentalni pogoji ne vplivajo na njegovo izražanje. Primeri hišnih genov so aktin, GAPDH in ubikvitin.
»HMG-box«	Proteinska domena, ki sodeluje pri vezavi DNA v procesih transkripcije, replikacije in popravljanja DNA, v vseh, kjer je potrebna sprememba konformacije kromatina.
Hrnilna plast	Plast celic, na katerih se goji embrionalne matične celice (EMC). S svojimi lastnostmi in interakcijami z EMC pomembne za vzdrževanje nediferenciranega stanja EMC.
Imunofenotip	Imunološki označevalci na površini celice. Določimo ga z imunocitokemičnimi reakcijami.
Inducirana pluripotentna matična celica (iPSC)*	Vrsta pluripotentnih celic, ki jih umetno pridobimo iz diferenciranih odraslih somatskih celic. Celice iPSC so pridobili s transfekcijo somatskih celic z zgodnjimi embrionalnimi geni, ki se značilno močno izražajo v pluripotentnih embrionalnih matičnih celicah (geni Oct-4, Sox-2 in nekateri drugi). Za prenos genov se lahko uporabi retrovirus ali druge vektorje. Celice iPSCs z izražanjem teh embrionalnih genov pridobijo vse lastnosti pluripotentnih celic.
<i>In vitro</i> *	Izraz, ki se uporablja za procese, ki potekajo v umetnem okolju izven živega bitja (npr. v epruveti).
<i>In vivo</i> *	Lat. v živem. Izraz, ki se uporablja za procese, ki potekajo v živem organizmu.

Interlevkini	Skupina citokinov, ki jih izločajo zlasti makrofagi. Interlevkini so pomembni medcelični mediatorji, ki sodelujejo zlasti pri komunikaciji med levkociti in tudi drugimi celicami imunskega sistema
Klonogenost	Sposobnost celice tvoriti klon, to pomeni proliferacijo ene specifične celice v celično populacijo.
Kloniranje*	Kloniranje (celice, živega bitja) je ustvarjenje enega ali več osebkov (celic), ki so genetsko identični izvornemu osebku (celici). Je torej vrsta umetnega nespolnega razmnoževanja. Izraz se uporablja tako za kloniranje bakterij kot tudi živali oz. človeka. Kloniranje DNA je pomnoževanje določenega odseka DNA in se uporablja pri tehnikah molekularne biologije. Kloniranje se lahko uporablja za reprodukcijo (reproaktivno) in za raziskovalne oz. terapevtske namene, pri čemer poskušajo pridobiti bolniku identične embrionalne matične celice (terapevtsko kloniranje).
Konfluenca*	Preraščenost dna gojilne posodice s celicami. Če so celice konfluentne pomeni, da so popolnoma prerasle dno posode.
Krvotvorne matične celice*	So multipotentne matične celice, ki se lahko razvijejo v vse tipe krvnih celic, kar vključuje mieloidne (monociti in makrofagi, nevtrofilci, bazofilci, eozinofilci, eritrociti, megakariociti/trombociti, dendritske celice) in limfoidne linije (T-celice, B-celice, NK-celice). Nahajajo se v kostnem mozgu.
Ksenogeno	Pridobljeno iz organizma druge vrste (npr. če gre za humano uporabo, iz živali).
Liposukcija	Kirurška tehnika za odstranitev lokaliziranega podkožnega maščevja z vsesavanjem skozi kanilo, uvedeno pod kožo.
Matična celica*	Nediferencirana celica, ki se s t.i.m. nesimetrično delitvijo lahko samoobnavlja, pri čemer nastane ena njej enaka hčerinska celica, hkrati pa druga, bolj diferencirana hčerinska celica. Ta ima manjši razvojni potencial, ker je bolj diferencirana.
Mezoderm*	Ena izmed treh zarodnih plasti, ki se razvije v mišice, kost in kri.
Mikromreža	Mreža z nanešenimi kratkimi odseki DNA kot sondami za identifikacijo posameznih genov. Lahko merimo izražanje in koncentracijo (moč izražanja) genov. Zaznavanje je fluorescentno.
Mezenhimske matične celice*	Multipotentne matične celice, ki se lahko diferencirajo v celice kosti, hrustanca, mišic in v maščobne celice. Nahajajo se tudi v kostnem mozgu, ki je vir mnogih vrst matičnih celic.
Morula*	Zgodnja stopnja v razvoju zarodka oziroma celic, ki nastane v prvih dneh po prvi delitvi zigote. Vsebuje okrog 16 celic. Z nadaljnimi delitvami se razvije v blastocisto.
Multipotentna matična celica*	Celica, z manjšo/ožjo potentnostjo/sposobnostjo diferenciacije kot pluripotentna in totipotentna matična celica. Multipotentna celica lahko tvori različne tipe celic, ki pa vsi pripadajo isti liniji. Večina tkivno specifičnih matičnih celic iz odraslih tkiv je multipotentnih. Primer: krvotvorna (hematopoetska) matična celica.
Niša*	Celično mikrokolje, ki nudi podporo in dražljaje, ki so nujno potrebni za ohranjanje samoobnovitvenega potenciala.

Notranja celična masa*	Notranja skupina celic v blastocisti, ki v kulturi <i>in vitro</i> tvori embrionalna telesca, iz katerih osamimo embrionalne matične celice
Onkogeni potencial	Zmožnost povzročanja maligne preobrazbe.
Oploditev <i>in vitro</i>	Oploditev jajčeca zunaj ženskega telesa, v epruveti.
Označevalci (pluripotentni, tkivno specifični)*	Genotipski (geni) ali fenotipski (proteini) označevalci, ki so značilni za določen tip celic. Z njimi lahko identificiramo celice.
Pasaža*	Presaditev celic v celični kulturi; ponavadi presaditev opravimo, ko celice v kulturi dosežejo konfluentno stanje.
Pluripotentna matična celica*	Celica, sposobna tvoriti vse telesne celice, vključno z germinalnimi celicami. Primer so embrionalne matične celice. Znanstveni dokaz, da so neke celice pluripotentne, je njihova sposobnost diferenciacije v celice vseh treh zarodnih plasti (endoderm in ektoderm in mezoderm).
Plastičnost*	Sposobnost odraslih matičnih, da se spremenijo v celico druge zarodne plasti ali da se spremenijo v odrasle celice drugega tkiva, kamor jih pred tem prenesemo. Te značilnosti pokažejo tkivne matične celice kot odgovor na fiziološke potrebe ali dražljaje. Mehanizem plastičnosti ni popolnoma pojasnjен in je sestavljen verjetno iz dediferenciacije, transdiferenciacije, transdeterminacije ter morda celo celične fuzije med odraslimi in matičnimi celicami.
Potentnost*	Sposobnost matičnih celic za diferenciacijo.
Prednja celica, tudi usmerjena, matična celica*	Potomka matične celice v direktni liniji. Je celica, iz katere nastanejo nove celice po seriji celičnih delitev. V človeškem telesu se iz progenitorne celice razvije več kot 200 različnih celičnih tipov.
Prilagojeno gojišče	Gojišče, ki se zbira s hranilnih celic in se uporabi za gojenje embrionalnih matičnih celic.
Regenerativna medicina*	Veja medicine, ki se ukvarja z obnovo fizioloških funkcij organov in tkiv in pri tem lahko uporablja tudi <i>in vitro</i> gojene celice, metode tkivnega inženirstva, različne naravne rastne faktorje in druge biotehniške metode.
Reprodukтивno kloniranje*	Cilj reproduktivnega kloniranja je ustvariti osebek, ki je genetsko identična kopija osebka, ki je daroval somatsko jedro, ki se vstavi v izpraznjen oocit (prenos somatskega jedra). Izpraznjeni oocit še vedno vsebuje vse sestavnine, ki so potrebne za razvoj v blastocisto. To lahko nato vsadimo v maternico, kjer se razvije v osebek. Prvi primer reproaktivnega kloniranja je bila ovčka Dolly.
Samoobnavljanje, Samopomnoževanje*	Posebna sposobnost matične celice, da s celično delitvijo nastane vsaj ena hčerinska celica, ki je popolnoma enaka materinski in ima enako latentno sposobnost diferenciacije. Vzdrževanje matičnosti je rezultat sodelovanja številnih mehanizmov in ekspresije t. im. pluripotentnih genov. Celična delitev je ponavadi asimetrična in zato se druga potomka lahko usmeri v določeno smer razvoja.

SCID	Je huda kombinirana imunska pomankljivost. Bolezen nastane zaradi nedeljujočih T in B- limfocitov. Obstaja več genetskih različic, skupno pa se kot posledice bolezni pojavljajo nezmožnost normalnega napredovanja v razvoju, kronična diareja in respiratorne infekcije ter limfopenija. SCID miške se uporabljajo za testiranje pluripotentnosti embrionalnih matičnih celic.
Serum	Tekoča frakcija krvi, ki so ji odstranjene krvne celice (eritrociti, levkociti, trombociti) in dejavniki strjevanja krvi (fibrinogen). Sestavljen je iz 90% vode, 7% beljakovin (albumini, globulini) ter 2% elektrolitov, hranil in hormonov.
Somatska celica*	Vsaka telesna celica razen gamet (jajčeca in spermiji).
Somatska matična celica*	Multi- ali oligopotentna, nediferencirana matična celica, ki jo v majhnem številu najdemo v različnih tkivih in organih ploda ali odrasle osebe. Do določene mere ima sposobnost samoobnavljanja in ustvarjanja potomk, ki se diferencirajo v specializirane celice tega tkiva oz. organa. Kaže, da se lahko odrasle matične celice diferencirajo tudi v celice drugih tkiv, kar imenujemo »plastičnost«.
Tkivno inženirstvo*	Kombinacija bioloških, inženirskev in medicinskev pristopov pri ustvarjanju bioloških nadomestkov za izgubljena ali okvarjena nativna tkiva.
Terapevtsko kloniranje*	Cilj terapevtskega kloniranja je pridobiti celice, ki so enake celicam bolnika. Pridobimo jih s prenosom somatskega jedra v izpraznjen oocit oz. kloniranjem odrasle celice. Iz klonirane blastociste lahko izoliramo embrionalnih matičnih celic, iz katerih lahko nato <i>in vitro</i> vzgojimo določena tkiva, ki so identična pacientu in zato po presaditvi bolniku ne pride do zavrnitvene reakcije. Terapevtsko kloniranje daje precejšne obete za zdravljenje v prihodnosti. Trenutno v Evropi še ni dovoljeno (stanje 1. 2009).
Teratokarcinom	Teratokarcinom je epiteljski malignom, ki je nastal iz pirojene razvojne napake kakega organa ali tkiva. Teratomi spadajo med teratokarcinome.
Teratom*	Tumor, sestavljen iz skupka različnih tipov tkiva. Vsebuje celice vseh treh zarodnih plasti. Če pluripotentne matične celice vbrizgamo v imunokompromitirane miške, se razvijejo v teratom, kar uporabljamo kot bistveni <i>in vivo</i> dokaz njihove pluripotentnosti.
Totipotentna matična celica*	Celica, sposobna tvoriti celoten organizem vključno z ekstraembrionalnim tkivom (trofoblast). Totipotentne celice v naravi so zigota in blastomere, ki nastanejo v zgodnjih celičnih delitvah morule, pred nastankom blastociste, ko pride do prve diferenciacije celic in izgube totipotentnosti. Pri rastlinah so totipotentne meristemske celice.
Transdeterminacija*	Proces, pri katerem predniške matične celice ene usmeritve nenadoma spremenijo v celice druge predniške usmeritve, npr. iz mezodermalnih nastanejo ektodermalne prednice. Pojem je privzet iz embriologije Drosophile, pri kateri so pod določenimi pogojji opazovali preobrazbe nog v krila in obratno. Transdeterminacija je verjetno naraven pojav in eden od mehanizmov plastičnosti matičnih celic. Mehanizem še ni popolnoma pojasnjen.

Transdiferenciacija*	Proces, pri katerem se tkivne matične celice iz enega tkiva odraslega spremenijo (oz. diferencirajo) v specializirane celice drugega tkiva. Transdiferenciacija je naraven pojav in je eden od mehanizmov plastičnosti matičnih celic. Mehanizem še ni popolnoma pojasnjen.
Trofoblast*	Del blastociste, ki ne pripada zarodku in se ugnezdi v maternično steno ter kasneje razvije v fetusni del placente.
Unipotentna celica*	Celica, ki je sposobna le razvoje v eno celično linijo.
Virusna transfekcija	Vnos genov v celico z virusi.
Zarodna celica (tudi klična)	Celica, iz katere izhajajo gamete (ženske oz. moške spolne celice).

* Rožman in Jež, 2009

1 UVOD

V človekovem telesu (in tudi pri živalih) se nahaja posebna vrsta celic, ki jih ohranjam v sebi vse življenje, imenujemo jih matične celice (MC, angl. stem cells). MC nam omogočajo, da se naša tkiva in organi, kljub številnim poškodbam in okvaram tkiv, do katerih prihaja v vsakdanjem življenju, obnavljajo. MC so nediferencirane celice zarodka (embrija) ali odraslega, ki imajo sposobnost dolgotrajnega deljenja (neskončno dolgo podvajanje) in tvorbe sebi identičnih kopij (samoobnavljanja) ter hkrati diferenciacije v bolj usmerjene tkivne celice. Najdemo jih v vseh tkivih odraslega človeka (epitelu (Slack, 2000), prebavilih (Marshman in sod, 2002), skeletnih mišicah (Asakura in sod., 2001), očeh (Coles in sod., 2004), jetrih (Herrera in sod., 2006), dojki (Böcker in sod., 2002), zobni pulpi (Miura in sod., 2003), koži (Alonso in Fuchs, 2003), lasnih mešičkih (Lavker in sod., 1993), periferni krvi (To in sod., 1997), maščobnem tkivu (Zuk in sod., 2002), testisih (De Rooij, 2003), prostatni (Hudson in sod., 2000), popkovnični krvi (McGuckin in sod., 2005) ter v ovarijih (Gosden, 2004)) in so odgovorne za nadomeščanje odmrlih celic ali popravljanje poškodb tkiv. Z njimi lahko zdravimo določene degenerativne, presnovne, prirojene in rakaste bolezni ter mehanske poškodbe tkiv in organov.

Matične celice glede na sposobnost diferenciacije lahko razdelimo na toti-, pluri-, multi- in unipotentne. Delitev je prikazana v **Preglednici 1**.

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

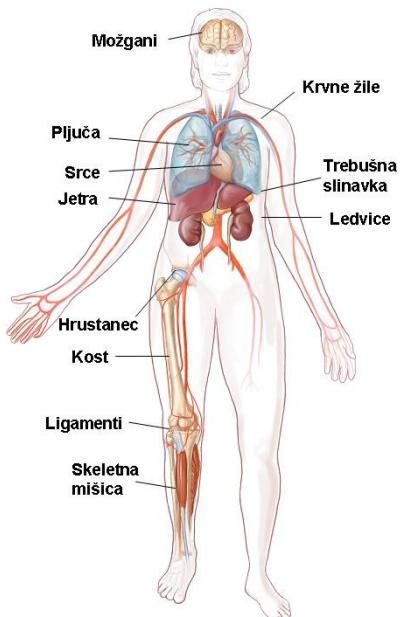
Totipotentne celice	Sposobne so se diferencirati v vse celične tipe, vključno s spermiji in jajčeci. Človeško telo sestavljajo različne vrste celic (teh je več kot 200) in vse izvirajo iz ene same celice zigote oz. oplojenega jajčeca. Totipotentno je torej oplojeno jajče.
Pluripotentne celice	Sposobne so se diferencirati v vse tri zarodne plasti (mezoderm, ektoderm in endoderm), ne morejo pa se več razviti v trofoblast (del blastociste, ki se vgnezdji v steno maternice in se kasneje razvije v posteljico). Take so npr. krvotvorne matične celice, hemangioblasti in mezenhimske matične celice. Sem spadajo tudi embrionalne matične celice.
Multipotentne celice (tudi oligopotentne)	Sposobne so se diferencirati v več celičnih tipov, vendar ne v vse. Take so npr. mieločne krvotvorne matične celice.
Unipotentne celice (predniške celice)	Sposobne so se diferencirati le v en celični tip. Take so npr. predniške epitelne matične celice.

Embrionalne matične celice (EMC) izvirajo iz celic zgodnjega zarodka, 5–7 dni po oploditvi (Thomson in sod., 1998). Teoretično se lahko razvijejo v katerokoli celico človeškega telesa. Pri postopkih gojenja nediferenciranih EMC in indukciji njihove diferenciacije *in vitro* je pomembno zagotovljati naslednje (Godier in sod., 2008):

- primeren substrat za pritrjanje kolonij EMC (hranilna plast ali matriks sestavljen iz ekstracelularnih proteinov, kot so laminin, fibronektin in vitronektin),
- sestava gojišč (regulatorne molekule, ki jih proizvajajo celice hranične plasti in delujejo kot parakrini dejavniki ali pa so dodane gojišču za gojenje EMC),

- medcelične stike (zaradi interakcij med celicami, ki so posledica gojenja EMC v skupih po 10 ali več celic, nastajajo avtokrini dejavniki in signali) in
- primerno tridimenzionalno okolje (biomateriali).

Hranilna plast je plast celic, običajno mišijih embrionalnih fibroblastov (MEF), ki se jo nasadi v gojilne posode, nanje pa se nato nasadi EMC. Celice hranilne plasti izločajo takšne ekstracelularne proteine, ki omogočajo pritrjanje EMC ter regulatorne molekule, ki so pomembne za vzdrževanje nediferenciranega stanja EMC. Raziskave gojenja EMC so usmerjene v iskanje primernih hranilnih plasti humanega izvora in več celičnih tipov se je že izkazalo za uspešne (več v Pregledu objav).



Slika 1: Tkiva, kjer se obeta zdravljenje z matičnimi celicami (Stem..., 2001)

Gojenje in diferenciacija EMC na t.i biomaterialih (biološko prenosljivih in razgradljivih tridimenzionalnih nosilcih) bi omogočilo pripravo človeških tkiv ali organov v laboratoriju. Ta pristop imenujemo tkivno inženirstvo. Tkvino inženirstvo kombinira biološke, inženirske in medicinske pristope pri ustvarjanju bioloških nadomestkov za izgubljena ali okvarjena nativna tkiva (Vunjak-Novakovic, 2006). Uspešni primeri tkivnega inženirstva so priprava nadomestkov hrustanca, kosti, ligamentov, krvnih žil, srčne mišice, skeletne mišice, jeter, trebušne slinavke, ledvic, pljuč in možganov (Vunjak-Novakovic, 2006; Stem..., 2001; **Slika 1**). Takšna tkiva je možno uporabiti kot *in vitro* modele za raziskave zgodnjega razvoja, raziskave različnih bolezni, za testiranja različnih zdravil in kemikalij ter kot nadomestna tkiva (Langer in Vacanti, 1993). Posebno pri uporabi za zdravljenje pa bo potrebno nadaljevanje raziskav, ki bodo zagotovile varnost uporabe matičnih celic. Pri presaditvi nediferenciranih matičnih celic pride do tvorbe teratomov, ker še nimajo razvitih nadzornih genetskih mehanizmov. Novejše študije nakazujejo možnost uspešne uporabe EMC za zdravljenje stanj po infarktu in poškodb centralnega živčnega sistema. Z uporabo takšnih celic vstopa regenerativna medicina v poplnom novo obdobje.

1.1 NAMEN DELA

Namen našega dela je preveriti ali lahko matične celice, ki se nahajajo v maščobnem tkivu, uporabimo za hranilne plasti pri gojenju EMC. Za matične celice, ki se nahajajo v maščobnem tkivu, smo se odločili, ker je maščobnega tkiva dovolj na razpolago ter bi se potencialno lahko uporabljal za pripravo avtolognih hranilnih plasti. Poleg tega so populacije celic, izolirane iz maščobnega tkiva, podobne mezenhimskim matičnim celicam iz kostnega mozga (stromalne celice), ki so jih že uspešno uporabili za hranilne plasti (Cheng in sod., 2003).

1.2 HIPOTEZA

Naša delovna hipoteza je bila, da se matične celice iz maščobnega tkiva v hranilnih plasteh obnašajo podobno kot mezenhimske matične celice iz kostnega mozga in podpirajo rast nediferenciranih EMC.

2 PREGLED OBJAV

2.1 EMBRIONALNE MATIČNE CELICE

Matične celice so bile odkrite pri preučevanju tipa raka, imenovanega teratokarcinom. Leta 1964 so raziskovalci ugotovili, da lahko izolirajo eno celico iz teratokarcinoma in ta bo ostala v kulturi nediferencirana. Ta tip celic je postal znan kot embrionalne karcinomske celice (Andrews in sod., 2005).

Embrionalne matične celice so prvič pridobili iz mišjih zarodkov leta 1981 (Evans in Kaufman, 1981; Martin, 1981).

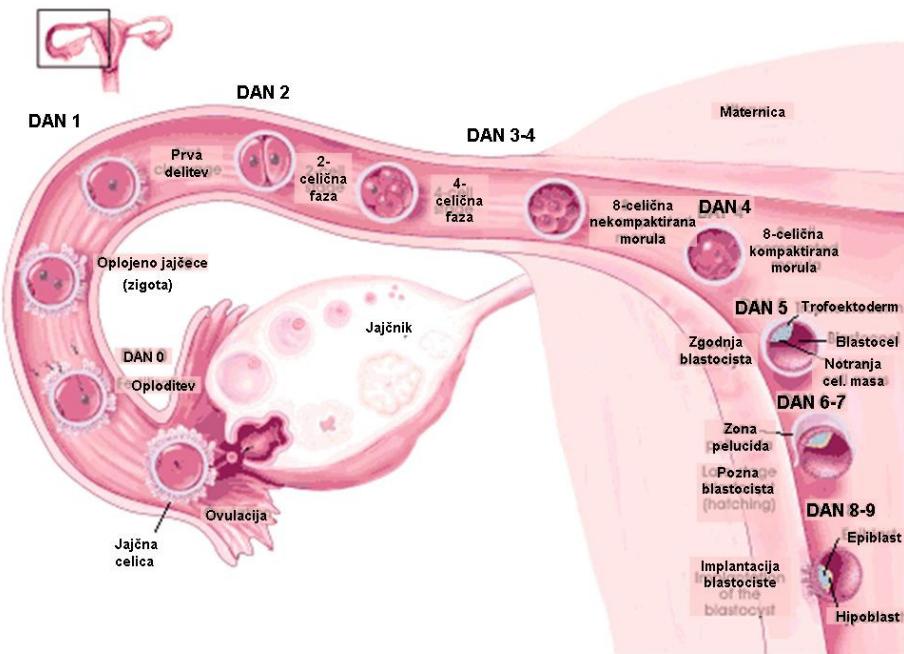
Prvo linijo človeških EMC je vzpostavil James A. Thomson s sodelavci leta 1998, iz blastociste, ki so jo pridobili s postopkom oploditve *in vitro* (IVF, angl. *in vitro* fertilization). Thomson in sod. so osamili celice notranje celične mase zarodka (ICM, angl. inner cell mass) v stopnji blastociste (**Slika 4**), preden se začnejo razvijati zarodne plasti novega organizma. ICM sestavlja 150 – 250 celic (Rožman in sod., 2007). Obdajajo jih celice trofoblasta, ki se vgnezdijo v steno maternice in se kasneje razvijejo v placento in druge strukture, ki povezujejo zarodek s krvnim sistemom matere. EMC lahko po izolaciji iz blastociste namnožimo v kulturi.

EMC lahko izoliramo tudi iz morule (Strelchenko in sod., 2004) (**Slika 3**) ali pa jih pridobimo iz posameznih izoliranih blastomer (Klimanskaya in sod., 2006).

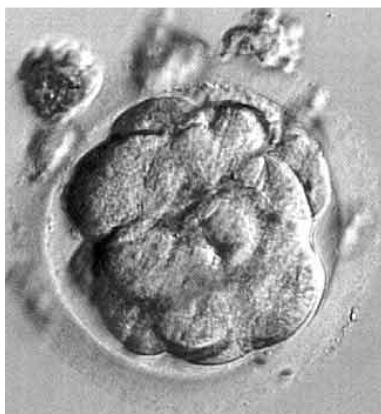
Zaradi uničenja blastociste oz. morule pri izolaciji so EMC etično sporne. V terapiji se še ne uporablajo, ker lahko po transplantaciji povzročijo nastanek tumorjev. EMC se lahko uporablajo za testiranje farmacevtskih substanc, za razvojne študije, za študij prirojenih napak in raka pri otrocih ter za pridobivanje gamet in zarodkov. EMC so pluripotentne, izražajo telomerazo zato se jim med delitvijo ohranja dolžina telomer. V kulturi lahko preživijo zelo dolgo časa in ohranjajo normalen kariotip, na voljo so tudi etablirane celične linije (Bongso in Richards, 2004).

Na **Sliki 2** je prikazan zgodnji embrionalni razvoj človeka.

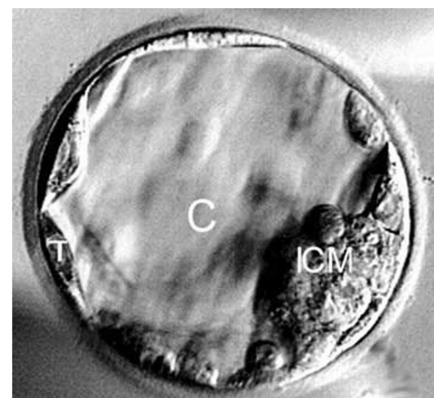
Človeške embrionalne matične celice lahko torej pridobimo na več načinov. Navadno jih pridobimo s postopkom oploditve *in vitro* (Thomson in sod., 1998), tj. v epruveti, kjer v laboratorijskem okolju združimo jajče in spermije. Drugi način pridobivanja embrionalnih matičnih celic je kloniranje (Hwang in sod., 2004), pri katerem jajčni celici odstranijo jedro, spermije pa nadomesti jedro ali cela somatska celica bolnika (angl. somatic cell nuclear transfer, SCNT). Med celicama pride do zlitja in nastanka nove totipotentne celice, ki se lahko po razvoju v morulo in blastocisto razvije v cel organizem. Torej lahko jedro diferencirane somatske celice reprogramiramo na stanje podobno embrionalnemu, če ga prenesemo v »izpraznjeno« jajčno celico. Tak pristop uporablajo pri reproduktivnem kloniranju (primer je znana ovca Dolly) (Wilmut in sod., 1997). Klonirane embrionalne matične celice, pridobljene iz blastociste, lahko gojimo *in vitro*, jih razmnožimo in nato uporabimo za zdravljenje bolnika, ki je prispeval somatsko celico. Ves postopek v tem primeru imenujemo terapevtsko kloniranje (Jaenisch in sod., 2002).



Slika 2: Razvoj predimplantacijske blastociste pri ljudeh (Stem..., 2001: A-4)



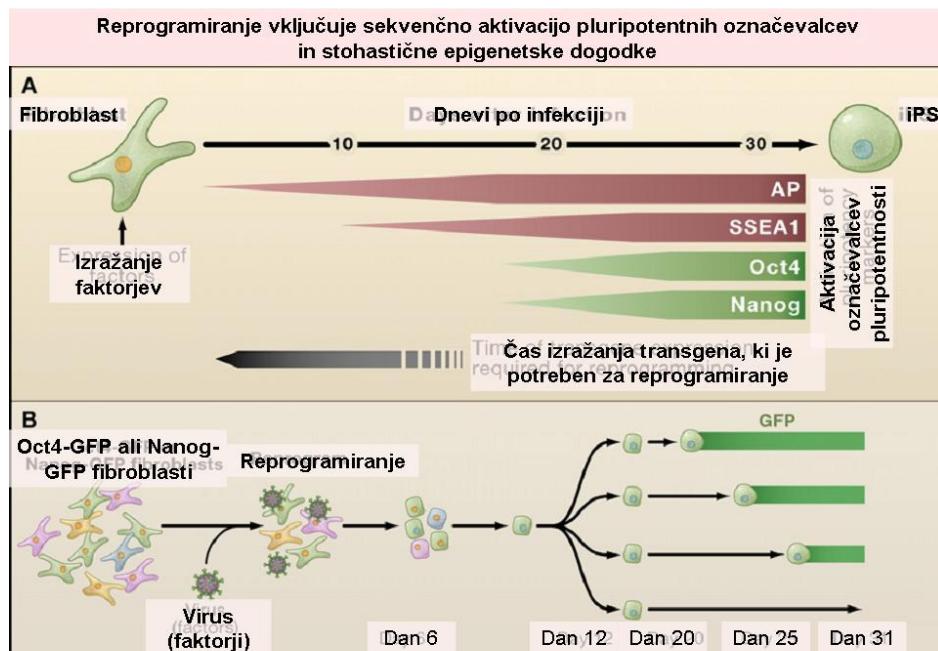
Slika 3: Morula 4 dni po oploditvi (*In vitro...*, 2009)



Slika 4: Blastocista 5 dni po oploditvi (notranja celična masa je označena z ICM, angl. inner cell mass) (Blastocyst..., 2009)

Zaradi že prej omenjene etične spornosti pridobivanja embrionalnih matičnih celic so se začele razvijati alternativne tehnike pridobivanja pluripotentnih celic. Leta 2006 je prišlo do odkritja, ki je močno razburkalo strokovno javnost. Takahashi in Yamanaka sta uspela odrasle mišje fibroblaste spremeniti v pluripotentne celice. Reprogramiranje (**Slika 5**) sta izvedla z vstavitevjo štirih genov (Oct-4, Sox-2, c-Myc in Klf) v fibroblaste s pomočjo virusne transfekcije. Te celice sta poimenovala inducirane pluripotentne matične celice (celice iPS, angl. induced pluripotent stem cells). Celice iPS kažejo lastnosti pluripotentnih MC (izražajo značilne označevalce, povzročajo teratome v SCID miškah, po injecirjanju v blastocisto sodelujejo pri tvorbi tkiv zarodka) (Takahashi in Yamanaka, 2006). Leto kasneje, novembra 2007, so pridobili tudi humane celice iPS (Takahashi in sod., 2007; Yu

in sod., 2007) in teoretično odprli možnost za pridobivanje MC iz skoraj vsake človeške celice. Slabost pri metodi reprogramiranja je bila uporaba gena c-Myc, ki je onkogen, še bolj pa retroviralni vnos genov, kar lahko kasneje pri bolniku privede do maligne alteracije presajenih celic. Lani, to je leta 2008, so pridobili celice iPS iz trebušnih in jetrnih celic odrasle miške z retrovirusnim vnosom genov. Te iPS celice so bolj podobne EMC kot celice iz predhodnih študij in tudi niso tumorigene. Novejše raziskave so usmerjene v nevirusne metode vnosa, saj so geni, ki so potrebni za reprogramiranje somatskih celic, lahko v genom vstavljeni na naključnih mestih (Aoi in sod., 2008).



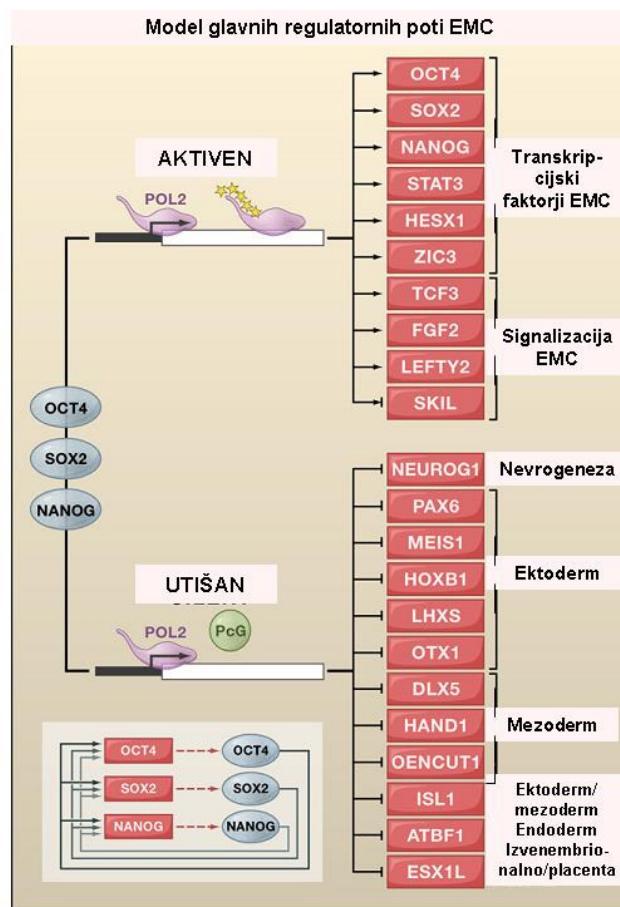
Slika 5: Reprogramiranje vključuje sekvenčno aktivacijo označevalcev pluripotentnosti in stohastičnih epigenetskih dogodkov (Jaenisch in Young, 2008: 572). (A) Kinetika pojavljanja označevalcev pluripotentnosti. Za alkalno fosfatazo in SSEA-1 pozitivne celice se lahko zazna že 3. ali 9. dan po transdukciji dejavnika, medtem ko se GFP izražen iz endogenega Oct-4 ali Nanog lokusa pojavi šele po dveh tednih. Virusno vnešeni dejavniki morajo biti izraženi dva tedna, da lahko začnejo proces reprogramiranja (Brambrink in sod., 2008). (B) V Oct-4-GFP ali Nanog-GFP fibroblaste so bili vnešeni štirje dejavniki. Kolonije, ki so kazale transformiran fenotip so bile GFP negativne in so bile klonirane nekaj dni po infekciji. Posledice kasnejšega kloniranja so bili subkloni, ki so aktivirali GFP ob različnih časih (Meissner in sod., 2007). Ker so bili subkloni pridobljeni iz iste okužene celice, je epigenetski dogodek pomemben za reprogramiranje.

2.1.1 Fenotip EMC

EMC izražajo površinske označevalce SSEA-4, Tra-1-60 in Tra-1-81 (in ne izražajo SSEA-1), transkripcijske dejavnike Oct-4, Sox-2, Nanog in c-kit (**Preglednica 2**), encime alkalna fosfataza in telomeraza ter ohranijo diferenciacijski potencial.

Genetske študije so najprej pokazale, da sta homeodomenska transkripcijska dejavnika Oct-4 in Nanog esencialna regulatorja zgodnjega razvoja in identitete EMC (Chambers in sod., 2003). Oba se izražata v pluripotentnih EMC in v notranji celični masi blastociste (ICM), iz katere se pridobi EMC. Motnja v Oct-4 in Nanogu povzroči izgubo pluripotentnosti in nepravilno diferenciacijo ICM in EMC v trofoektoderm in

izvenembrionalni endoderm (Chambers in sod., 2003). Zadnje raziskave nakazujejo funkcijo Nanoga v smeri stabilizacije pluripotentnega stanja, bolj kot v smeri ohranjanja pluripotentnosti EMC (Chambers in sod., 2007). Oct-4 lahko tvori heterodimer s »HMG-box« (angl. high mobility group box) transkripcijskim dejavnikom Sox-2 v EMC in Sox-2 prispeva k pluripotentnosti, vsaj delno, z regulacijo ravni Oct-4 (Masui in sod., 2007). Oct-4 se med zgodnjim diferenciacijo celice utiša. Ključne vloge, ki jih igrajo Oct-4, Sox-2 in Nanog med zgodnjim embrionalnim razvojem in njihov unikaten vzorec izražanja (Chambers in sod., 2003) napeljujejo k vlogi teh regulatorjev, ki je osrednja v transkripcijski regulatorni hierarhiji, ki določa identiteto EMC (**Slika 6**).



Slika 6: Model glavnih regulatornih poti EMC (Jaenisch in Young, 2008: 574). Oct-4, Sox-2 in Nanog transkripcijski dejavniki (modro) zasedejo transkripcijsko aktivne gene, vključno s transkripcijskimi dejavniki in signalnimi komponentami, ki so potrebne za vzdrževanje stanja EMC. Ti trije regulatorji tudi zasedejo utišane gene, ki kodirajo transkripcijske dejavnike, ki, če so izraženi, povzročajo druga bolj diferencirana stanja celic. Na tem drugem setu genov RNA polimeraza II (POL2) začne transkripcijo, a ne proizvaja celotnih transkriptov zaradi represivne vloge Pcg proteinov. Pcg proteini preprečijo RNA polimerazi, da bi postala popolen transkripcijsko-elongacijski aparat (kot je prikazano s fosforiliranimi »zvezdicami« na repu POL2 encima). Avtoregulatorna zanka, kjer se Oct-4, Nanog in Sox-2 povežejo vsak s svojim promotorjem je prikazana spodaj levo.

Identifikacija genov, na katere vplivajo Oct-4, Sox-2 in Nanog, je omogočila vpogled v molekularne mehanizme, s katerimi ti transkripcijski dejavniki prispevajo k pluripotentnosti v humanih in mišijih EMC (Boyer in sod., 2005). Ti eksperimenti so

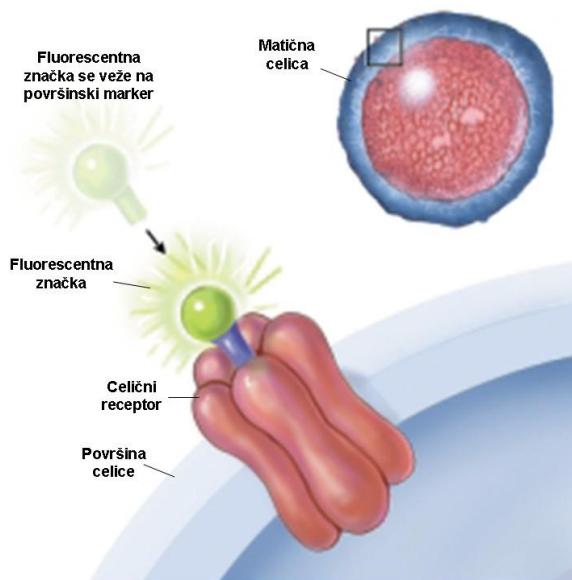
prinesli tri ključne ugotovitve: (1) Oct-4, Sox-2 in Nanog se skupaj vežejo na lastne promotorje in tvorijo med seboj povezano avroregulatorno zanko, (2) pogosto hkrati zasedejo tarčne gene in (3) Oct-4, Sox-2 in Nanog hkrati delujejo na dva seta genov, na enega, ki se aktivno izraža in na drugega, ki je utišan v EMC, a ostane pripravljen za naknadno izražanje med celično diferenciacijo (Boyer in sod., 2005). Ta opažanja so razkrila ključne značilnosti genetske logike pluripotentnosti in zagotovila dokaze za to, kako multipli transkripcijski regulatorji lahko skupaj nadzirajo celično identiteto.

Diferencijski potencial celic se lahko preveri z *in vitro* gojenjem v obliki embrioidnih teles, ali pa se celice presadi v SCID miške z okvarjenim imunskim odzivom in ugotavlja nastanek teratomov (Characterization..., 2007).

Preglednica 2: Embrionalni označevalci – transkripcijski dejavniki

Označevalec	Funkcija
Oct-4	Je ključni regulator pluripotentnosti in pripada družini POU transkripcijskih dejavnikov (sinonimi: POU5f1, Oct-3, Oct-3/4). Izraža se v EMC. Njegovo izražanje se zmanjša, ko se celice diferencirajo. Je edini znani transkripcijski dejavnik, ki se specifično izraža v zgodnjem zarodku, zarodnih celicah in pluripotentnih celicah. Z eksperimenti s transgenskimi mišjimi celicami so dokazali, da je Oct-4 nujen za pluripotentnost celic – zarodki z inaktiviranim <i>Pou5f1</i> lokusom niso bili sposobni razviti ICM. Kvantitativne študije pa so pokazale, da EMC v odvisnosti od ravni izražanja Oct-4 vzdržujejo pluripotentnost ali pa diferencirajo (Morris in sod., 2005).
Sox-2	Sox-2 je gen brez intronov, ki kodira transkripcijski dejavnik SOX-2 (sinonim: SRY-box 2, sex determining region-box 2), ki je ključen za samoobnavljanje in ohranjanje nediferenciranega stanja EMC (SOX2 SRY, 2008).
Nanog	Transkripcijski dejavnik Nanog je pomemben regulator v zgodnjem razvoju sesalcev in ključen dejavnik za določanje pluripotentnosti v EMC. Nanog se veže na promotorje več sto genov in preko še vedno neznanih mehanizmov regulira njihovo izražanje. Izražanje genov lahko regulira pozitivno ali negativno. Mutacija, kjer je izničena funkcija Nanoga je letalna že v embrionalnem razvoju, povzroči pa tudi diferenciacijo v linijo EMC podobno endodermu. Povečano izražanje Nanoga pa omogoči samoobnavljanje mišjih EMC brez prisotnosti leukemičnega inhibitornega dejavnika (LIF). Zmanjšano izražanje Nanoga v EMC vodi v diferenciacijo celic. Zanimivo je, da se Nanog veže na promotorje, na katere se vežeta tudi Oct-4 in Sox-2 (Jauch in sod., 2008).
c-kit	c-kit je tirozin kinazni receptor, ki se izraža na krvotvornih celicah, predniških celicah in tudi na celicah iz nekrvotvornih tkiv. Humani tirozin kinazni receptor se imenuje tudi CD117, nanj pa se veže »stem cell« dejavnik. V KM se c-kit specifično izraža na predniških celicah. Med zorenjem celic se njegovo izražanje zmanjša, z izjemo pri mastocitih, kjer se ohrani visoko izražanje. Pri miših je posledica mutacij v lokusu, ki kodira receptor ali v lokusu, ki kodira ligand, letalna anemija, napake KMC in pomanjkanje mastocitov. Receptor c-kit sproža več signalnih poti, ki so pomembne za regulacijo proliferacije, preživetja in drugih ključnih funkcij KMC. Ima tudi onkogeni potencial, saj konstitutivno izražanje c-kit receptorja lahko povzroči nastanek tumorja (Edling in Hallberg, 2007).

Označevalce EMC lahko detektiramo z imunološkim barvanjem s fluorescentno označenimi protitelesi (**Slika 7**) in PCR v realnem času.



Slika 7: Identifikacija površinskih označevalcev s pomočjo fluorescentnih značk (Stem..., 2001: E-2)

EMC so klonogene, to pomeni, da lahko iz ene same EMC nastane kolonija genetsko identičnih celic ali klonov, ki imajo enake lastnosti kot originalna celica (Stem..., 2001).

V celičnem ciklu EMC manjka nadzorna točka G1, tako so večino časa v S fazi, med katero sintetizirajo DNA. Za razliko od diferenciranih somatskih celic EMC ne potrebujejo stimulusa za iniciacijo replikacije DNA.

EMC ne kažejo inaktivacije kromosoma X. V vsaki somatski celici ženske je eden izmed dveh kromosomov X inaktiviran. To se ne zgodi v nediferenciarnih EMC (Stem..., 2001).

2.1.2 Sprosobnost diferenciacije EMC

Pluripotentne EMC se lahko razvijejo (diferencirajo) v celice vseh treh primarnih zarodnih plasti zarodka (endoderma, mezoderma in ektoderma), to je v vseh 200 različnih tipov celic, ki gradijo človeško telo (Meng in sod., 2007).

Obstaja mnogo različnih tehnik za diferenciacijo EMC. Te vključujejo odstranjevanje kemičnih signalov in molekularnih vzrokov za vzdrževanje nediferenciranega stanja, medtem ko hkrati zagotavljajo molekularne signale, ki povzročajo diferenciacijo. Običajno se EMC diferencira v dvodimenzionalni (2D) kulturi ali v suspenzijski kulturi celičnih agregatov ali sferoidov, ki lahko nastanejo klonalno ali z agregacijo mnogih EMC. Te celične aggregate imenujemo embrioidna telesca (ET), ker posnemajo mnogo vidikov normalnega embrionalnega razvoja. Druga metoda, ki je bila razvita je indukcija diferenciacije in organizacije celic v tridimenzionalnem (3D) polimernem nosilcu.

ET lahko nastanejo na mnogo načinov, ki vključujejo suspendiranje celic v gelih, ki omejujejo njihovo migracijo, prenos in gojenje celic v neadhezivnih posodah in nasajanje celic z metodo visečih kapljic, kar sproži oblikovanje celičnih agregatov (Levenberg in sod., 2006).

V 2D kulturi pride do spontane diferenciacije zaradi odvzema dejavnikov, ki povzročajo samoobnovo celic. Npr. pri mišjih EMC bi odvzeli dejavnik LIF. V primeru humanih EMC je potrebna posebna previdnost pri odstranjevanju hranilnih celic iz kulture. To se običajno naredi z ločevanjem EMC od posode s kolagenazo. Raztopljene EMC se nato nasaja direktno v gojilne posode, ki so predhodno prekrite z želatino (Levenberg in sod., 2006).

Polimerni nosilci predstavljajo obetajoč sistem za oblikovanje 3D tkiv med postopkom diferenciacije. Omogočajo fizčne iztočnice za orientacijo in razširjanje celic. Imajo pore, ki omogočajo prostor za preoblikovanje tkivnih struktur. Lahko se uporabi tudi usmerjena razgradnja nosilca kot orodje za lokalizirano in kontrolirano dostavo rastnih dejavnikov. *In vitro* diferencirani tkivni konstrukti so potencialno uporabni za presaditve (Levenberg in sod., 2006).

Diferencirane celice lahko nato izoliramo iz kulture z različnimi tehnikami (ločevanje fluorescentno označenih celic – FACS, gensko spremenjeni selekcijski označevalci, prednostno odlepljanje in pritrjanje, mehanska izolacija definiranih struktur). Nato izolirane diferencirane celice okarakteriziramo (izražanje specifičnih označevalcev...). S prenosom v večje merilo (angl. scale-up) lahko pridobljene informacije prenesemo v tkivno inženirstvo (Levenberg in sod., 2006).

Kot označevalci diferenciacije se pogosto pojavljajo geni Brachyury, Pax-6 in Sox-17. Izražanje gena Brachyury nakazuje diferenciacijo v mezoderm (Yamaguchi in sod., 1999), izražanje gena Pax-6 diferenciacijo v ektoderm (Li in sod., 1994) in izražanje gena Sox-17 diferenciacijo v endoderm (Sinner in sod., 2004).

EMC se lahko razvijejo v katerokoli celico. Za razliko od njih so odrasle MC bolj omejene v diferenciacijskem potencialu.

MC lahko torej iz njihovega naravnega okolja presadimo v novo mikrookolje. Takrat pridobijo lastnosti, ki ustrezajo novemu okolju. To sposobnost prilagoditve in spremembe matične celice imenujemo plastičnost (Rožman in sod., 2007; Zipori, 2005; Ratajczak in sod., 2008). Plastičnost pomeni, da so matične celice poleg samoobnavljanja, proliferacije in diferenciacije sposobne pridobiti tudi fenotip celic iz drugečnega tkiva, v določenih primerih pa celo preskočiti iz ene zarodne plasti v drugo (npr. iz mezoderma v endoderm). MC imajo torej sposobnost spremeniti se v odrasle celice, ki imajo značilne lastnosti in specializirano delovanje, npr. srčne, kožne ali živčne celice. V znanstvenih krogih trenutno prevladuje mnenje, da je plastičnost možna, a se naravno pojavlja zelo redko (npr. da bi mezenhimska celica postala živčna ali srčna celica).

Preglednica 3: Komponente plastičnosti matičnih celic (Rožman in sod., 2007; Zipori, 2005)

Dediferenciacija	Razvoj odrasle ali linijsko usmerjene celice prednice v bolj primitivne oblike.
Transdeterminacija	Preskok v drugo predniško celično linijo.
Transdiferenciacija	Sposobnosti, ki omogoči diferencirani celici, da pridobi fenotipske značilnosti druge diferencirane celice.

Plastičnost oz. spremenljivost matičnih celic je osupljiva in kaže, da je sestavljena iz štirih elementov: iz sposobnosti za dediferenciacijo, transdeterminacijo, transdiferenciacijo

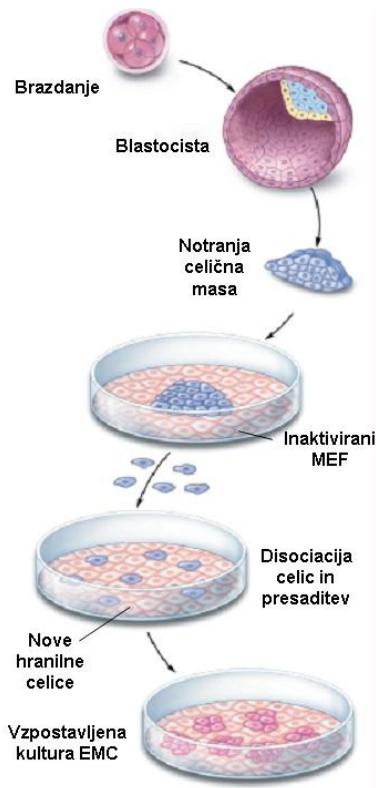
(Preglednica 3) in celo za fuzijo z drugimi, že diferenciranimi celicami v tkivu, iz česar nastane popolnoma nova celična vrsta.

2.2 POSTOPKI GOJENJA EMC

Populacije matičnih celic se nahajajo v »nišah« – specifičnih anatomskeh lokacijah, ki uravnavajo nastanek, vzdrževanje in popravilo tkiv z matičnimi celicami. Niša varuje matične celice pred izčrpanjem, medtem ko ščiti gostitelja pred prevelikim pomnoževanjem matičnih celic. Tvorí osnovno enoto tkivne fiziologije in vključuje signale, ki zagotavljajo uravnovešen odziv matičnih celic na potrebe organizmov. Niša lahko tudi izzove patologije, saj lahko povzroči nepravilno delovanje matičnih celic ali drugih komponent znotraj niše. Interakcija med matičnimi celicami in njihovimi nišami ustvarja dinamični sistem, ki je potreben za obstoj tkiv in za temeljen koncept delovanja zdravil iz matičnih celic. Lokacija matičnih celic ni dovolj za določitev niše, saj ima niša tako anatomske kot funkcionalne dimenzije (Scadden, 2006). Pri vretenčarjih nišo EMC *in vivo* predstavlja trofoblast.

Niše lahko posnemamo *in vitro* z vzpostavitvijo primerenega okolja za gojenje EMC, pri čemer imajo pomembno vlogo hranilne plasti. Hranilna plast ni definirano okolje gojenja.

Na **Sliki 8** je prikazan postopek vzpostavitve linije EMC.



Slika 8: Postopek vzpostavitve linije EMC (Stem..., 2001: C-2)

Poleg hranilnih plasti pa je pri gojenju EMC zelo pomembna sestava gojišča.

2.2.1 Sestava gojišča za gojenje EMC

Osnova gojišča za gojenje EMC je KO-DMEM z visoko vsebnostjo glukoze ali mešanica DMEM/F12, kateremu je dodan serum ali serumski nadomestek, neesencialne aminokisline, L-glutamin, β -merkaptoetanol in bFGF (Preparation..., 2007; Characterization..., 2007)

Tradicionalno gojišče vsebuje FBS (fetusni serum goveda, angl. fetal bovine serum) (Thomson in sod., 1998), a se vedno bolj nadomešča z različnimi alternativami. Ena izmed teh je humani serum (Richards in sod., 2002). Problem s FBS in humanim serumom je, da sta kompleksni mešanici, ki vsebujujo neznane sestavine. Vsaka serija se tudi razlikuje v sposobnosti vzdrževanja EMC v nediferenciranem stanju. Serum lahko tudi vsebuje dejavnike, ki inducirajo diferenciacijo EMC. Da bi se izognili tem problemom, nekateri raziskovalci uporabljajo optimizirane brezserumske pogoje in uporabljajo bazični fibroblastni rastni dejavnik (bFGF, angl. basic fibroblast growth factor) in bolj definiran nadomestek seruma (KO-SR, angl. knockout serum replacement), ki še vedno vsebuje živalske proteine. Koivisto in sod. (2004) poročajo, da se EMC hitreje delijo v gojišču, ki vsebuje nadomestek seruma, kot v gojišču s FBS.

Raziskovalci so pojav raziskovali naprej – z metodo mikromrež so ugotavljeni vzorec izražanja genov v obeh gojiščih (Skottman in sod., 2005). Čeprav je bilo izražanje mnogih znanih označevalcev EMC podobno, prav tako diferenciacijska sposobnost embrioidnih teles, je bilo preko 100 genov drugače izraženih. Iz tega lahko predvidevamo, da so spremembe v sestavi gojišča zelo pomembne za EMC. Pri optimizaciji gojišča je torej potrebno nadzorovati spremembe v izražanju genov. Gojišče z nadomestkom seruma se lahko uporablja tudi za pridobivanje novih linij EMC (Inzunza in sod., 2005).

Za razliko od mišjih EMC, dejavnik LIF (angl. leukemia inhibitory factor) ne more vzdrževati nediferencirane rasti humanih EMC brez hranilnih celic in zato ni komponenta, ki bi imela pomemben vpliv na EMC. Do sedaj še ni bila odkrita nobena komponenta, ki bi imela na humane EMC takšen vpliv, kot ga ima LIF na mišje EMC.

Novejše študije kažejo, da igra pomembno vlogo pri vzdrževanju pluripotentnosti EMC bFGF (Xu in sod., 2005b; Levenstein in sod., 2006). bFGF je potreben, da celice ostanejo v nediferenciranem stanju (inducira izražanje gremlina, ki inhibira indukcijo diferenciacije s kostnimi morfogenimi proteinimi) (Pereira in sod., 2000). Nujen je v kulturi na hranilnih celicah kot tudi v kulturah brez hranilnih plasti in brezserumskih sistemih. Dodatek visokih koncentracij bFGF lahko podpira rast EMC na Matrigelu brez predhodnega prilagajanja gojišča na hranilnih celicah (Xu in sod., 2005a).

2.2.2 Hranilne plasti in substrati za gojenje EMC

Kot je že omenjeno v uvodu, so hranilne plasti s svojimi lastnostmi in interakcijami z EMC pomembne za vzdrževanje nediferenciranega stanja EMC. Hranilne plasti so osnova za gojenje EMC in so zelo pomembne v različnih raziskavah (raziskovanje embrionalnega razvoja, diferenciacije v tkiva različnih zarodnih plasti, potencialna uporaba diferenciranih celic v regenerativni medicini...). Ker pa so tradicionalno uporabljeni MEF živalskega izvora, se jih skuša nadomeščati s človeškimi celičnimi linijami, znanstveniki pa vzpostavljajo tudi kulture EMC, ki bi se jih lahko gojijo brez hranilnih plasti. Živalske

celice so lahko izvor ksenogenov (lahko je neživa živalska komponenta, torej ni patogen, pa morda povzroča odziv telesa) in patogenov, ki ne smejo biti prisotni v primeru terapevtske uporabe.

Kulture EMC lahko »humaniziramo« z nadomestitvijo MEF s primarnimi človeškimi celicami ali imortaliziranimi človeškimi celičnimi linijami. Za več celičnih tipov je že bilo pokazano, da podpirajo nediferencirano rast EMC. Taki so primarni človeški fibroblasti iz prepucija (Hovatta in sod., 2003; Inzunza in sod., 2005), fetusni fibroblasti (Richards in sod., 2002; Lee in sod., 2004), parenhimske celice iz dojke (Lee in sod., 2004), epitelne celice iz jajčnikov (Richards in sod., 2004), endometrijske celice iz maternice (Lee in sod., 2004), fibroblasti iz posteljice (Genbacev in sod., 2005) in stromalne celice iz kostnega mozga (Cheng in sod., 2003). Prav tako so bile uspešno uporabljene avtogenske hranilne celice, ki so bile pridobljene z diferenciacijo samih EMC (Stojkovic in sod., 2005; Wang in sod., 2005).

V študijah, ki zmanjšujejo uporabo živalskih komponent, so EMC ohranile podobne značilnosti kot EMC, gojene na MEF. Prav tako so izražale površinske označevalce SSEA-4, Tra-1-60 in Tra-1-81 (in niso izražale SSEA-1), transkripcijske dejavnike Oct-4, Sox-2 in Nanog, encime alkalno fosfatazo in telomerazo ter ohranile diferenciacijski potencial, ko so jih gojili v embrioidnih telescih ali jih presadili, da so tvorile teratome v ksenotransplantatih.

Manj raziskav je bilo usmerjenih v preučevanje specifičnih značilnosti različnih hranilnih celic in mikrookolij, ki jih te proizvajajo (na primer profil citokinov, ki jih izločajo) v sokulti z EMC. Tako so izražanje vimentina (značilen je za mezenhimske matične celice) zaznali pri fibroblastih iz posteljice in avtogenskih hranilnih celicah (Genbacev in sod., 2005; Wang in sod., 2005). Avtogenske hranilne celice izražajo nekatere označevalce mezenhimskih matičnih celic (MMC) (Stojkovic in sod., 2005a). Tipičen MMC označevalc pa je bil zaznan tudi na stromalnih celicah kostnega mozga, uporabljenih za hranilne plasti (Cheng in sod., 2003).

Z namenom razviti alternative dokaj nedefiniranim pogojem v »humaniziranih« kulturah, so se mnoge študije osredotočile na določanje natančnih sestavin substrata in gojišča, ki omogočajo gojenje nediferenciranih EMC. V eni od prvih študij je Xu s sod. (2001) pokazal, da lahko EMC gojimo na Matrigelu (ekstrakt bazalne membrane Engelbreth-Holm-Swarmovega mišjega tumorja, ki ga sestavlja laminin, kolagen tipa IV, entaktin, heparin sulfatni proteoglikani in rastni dejavniki) in samem lamininu kot substratu, če uporabimo gojišče, ki je bilo prilagojeno na MEF. Alternativno so celice uspešno gojili na Matrigelu v gojišču, ki je bilo prilagojeno z inkubacijo na avtogenskih hranilnih celicah (Stojkovic in sod., 2005a).

Gojenje EMC na definiranem matriksu bo omogočalo strikten nadzor nad vključenimi sestavinami. Leta 2006 so Ludwig in sodelavci objavili protokol za popolnoma definiran postopek gojenja EMC, ki izkorišča proteinske sestavine, ki so pridobljene iz rekombinantnih virov ali čisti humani material. Z uporabo tega protokola so raziskovalci pridobili dve novi celični liniji EMC. Na žalost sta bili obe kariotipsko nenormalni po sedmih mesecih v kulturi (Ludwig in sod., 2006), kar je upravičilo nadalnje raziskovanje.

Preglednica 4: Različni viri hranilnih plasti in njihove značilnosti

Hranilna plast	Značilnosti hranilne plasti	Referenca	Pasaža	Linija EMC	Običajna karakterizacija EMC celic
Živalska hranilna plast	Mišji embrionalni fibroblasti	Thomson in sod., 1998	<5	H1*, H7*, H9*, H13*, H14*	Površinski antigeni: <i>imunocitokemija, pretočna citometrija, SSEA-3, SSEA-4, SSEA-1, Tra-1-60, Tra-1-81</i>
		Richards in sod., 2002	<5	HES-3, HES-4	
	Celična linija STO	Park in sod., 2003	Linija	Miz-hES1*, Miz-hES2*, Miz-hES3*	
Avtogenska granilna plast	Hranilne celice pridobljene iz EMC	Wang in sod., 2005	5,15	H1, SH1, SH2, SH7*	Transkripcijski dejavniki: <i>imunocitokemija, gensko izražanje, Oct-4, Nanog, Sox-2, Rex-1</i>
		Stojkovic in sod., 2005a	2-12	hES-NCL1, H1	
		Xu in sod., 2004	Linija	H7, H9	
Človeške hranilne plasti	Embrionalni fibroblasti	Lee in sod., 2004	3	Miz-hES1	Encimi: <i>imunocitokemija, histokemija, gensko izražanje, alkalna fosfataza, telomeraza</i>
	Fibroblasti iz kože fetusa	Richards in sod., 2002	4-9	HES-3, HES-4	
		Richards in sod., 2003	4-8	HES-3, HES-4	
	Fibroblasti iz mišice fetusa	Richards in sod., 2002	4-9	HES-3, HES-4	
		Richards in sod., 2003	4-16	HES-3, HES-4	
	Epitelne celice iz jajčnika	Richards in sod., 2002	4-9	HES-3, HES-4	
		Richards in sod., 2003	4-8	HES-3, HES-4	
	Celice iz placente	Genbacev in sod., 2005	7	HSF1, HSF6, H1, H9, UCSF-1*, UCSF-2*	Kariotip: G-proganje
	Celice iz endometrija maternice	Lee in sod., 2004	3	Miz-hES1	
		Lee in sod., 2005	3-25	Miz-hES9*, Miz-hES14*, Miz-hES15*	
	Stromalne celice iz kostnega mozga	Cheng in sod., 2003	2-5	H1	
	Fibroblasti iz prepucija	Amit in sod., 2003	>25	I-3, I-6, H-9	
		Hovatta in sod., 2003	?	HS181*, HS207*	
		Inzunza in sod., 2005	?	HS293*, HS306*	
	Parenhimske celice iz dojke	Lee in sod., 2004	3	Miz-hES1	
	Fibroblasti iz kože	Richards in sod., 2003	4-16	HES-3, HES-4	

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Substrat	Značilnosti substrata	Referenca	Dodatki h gojišču	Linija EMC	
ekstracelularni matriks	Človeški serum	Stojkovic in sod., 2005b	cond-AFL	hES-NCL1, H1	Diferenciacija embrioidnih teles: <i>imunocitokemija, gensko izražanje, linijsko značilni označevalci</i>
	Matrigel	Xu in sod., 2001	cond-MEF	H1, H7, H9, H14	
		Braam in sod., 2008	cond-MEF, mTeSR1	HUES1	
		Stojkovic in sod., 2005a	cond-AFL	hES-NCL1, H1	
		Ludwig in sod., 2006	TeSR1	H1, H7, H9, H14	
	Laminin	Xu in sod., 2001	cond-MEF	H1, H7, H9, H14	
		Braam in sod., 2008	cond-MEF	HUES1	
	Fibronektin	Amit in sod., 2004	SR, TGFβ1, LIF, bFGF	I-3, I-6, H9	Tvorjenje teratomov: <i>histologija</i>
		Braam in sod., 2008	cond-MEF	HUES1	
Kolagen IV	Braam in sod., 2008	cond-MEF	HUES1	Mikrobiološki status: <i>testiranje sterilnosti, testiranje za mikoplazmo</i>	
Lminin, fibronektin, kolagen IV, vitronektin	Ludwig in sod., 2006	TeSR1	H1, H9, WA15*, WA16*		
Vitronektin	Braam in sod., 2008	mTeSR1	HUES1		

Označbe linij EMC so navedene kot v prvotni referenci. * označuje na novo vzpostavljene linije EMC; MEF, mišji embrionalni fibroblasti; AFL, autogenska hranilna plast (angl. autogeneic feeder layer); cond, kondicionirano gojišče; SR, nadomestek seruma (angl. serum replacement); TGFβ1 (angl. transforming growth factor β1); LIF (angl. leukemia inhibitory factor); bFGF, bazični fibroblastni rastni dejavnik (angl. basic fibroblast growth factor); TeSR1/mTeSR1, definirano gojišče za gojenje EMC; SSEA (angl. stage-specific embryonic antigen); Tra, okrajšava za antigene prisotne na EMC; Oct-4, oktamer-4 (angl. octamer-binding transcription factor 4); Sox-2 (angl. SRY-related HMG-box gene 2); Rex-1, (angl. RNA exonuclease 1).

Nedavno so znanstveniki pokazali, da rekombinantni vitronektin podpira rast EMC v definiranem gojišču (kolagen IV, fibronektin in laminin so bili izločeni iz substrata) (Braam in sod., 2008).

Študije so pokazale, da topografija substrata igra veliko vlogo v gojenju EMC in njihovi morfologiji (porazdelitev in raztezanje) in da citoskelet igra aktivno vlogo v odzivu na kontaktno usmerjanje EMC (Gerecht in sod., 2007a). Nadaljne študije so potrebne za pojasnitev kako različni pogoji gojenja vplivajo na fenotip in specifičen diferenciacijski potencial različnih linij EMC ter možnost uporabe definiranega postopka gojenja EMC (Ludwig in sod., 2006) za gojenje iPC (Takahashi in sod., 2007; Yu in sod., 2007).

Povzetek nedavnih študij, ki prikazuje obseg eksperimentalnih pogojev in komponent, uporabljenih za gojenje EMC je prikazan v **Preglednici 4**.

2.3 ODRASLE MATIČNE CELICE

Razlike med odraslimi MC in EMC so številne (**Preglednica 5**). MC odraslega so multipotentne, v zelo majhnem številu se nahajajo v organih od koder jih je tudi težko izolirati. Prave celične linije odraslih MC ne obstajajo, tudi ni dobro poznano, v kolikšni meri se *in vitro* ohranja normalen genetski profil celic. So pa že znane študije, ki kažejo, da prihaja do okvar ob daljšem gojenju (Robio in sod., 2005; Bochkov in sod., 2007; Meza-Zepeda in sod., 2008; Izpadanah in sod., 2008).

Preglednica 5: Razlike med hMC odraslega in hEMC (Bongso in Richards, 2004)

hMC odraslega	hEMC
MC se nahajajo v organih v zelo majhnem številu, težko jih je izolirati	Nahajajo se v notranji celični masi blastociste. Ko jih imamo izolirane, jih lahko namnožimo v velikem številu
Celične linije ne obstajajo	Na voljo so celične linije, enostaven »scale-up« (povečevanje)
Multipotentne	Pluripotentne
Ni znano ali <i>in vitro</i> ohranjajo normalen genetski profil	Normalen kariotip ohranjajo tudi skozi veliko število pasaž
Nizka stopnja izražanja telomeraze	Visoka stopnja izražanja telomeraze, neomejeno samoobnavljanje celic
S staranjem se jim krajšajo telomere	Telomere se ne krajšajo
Zgodnja apoptoza	Pozna apoptoza
Ni mogoče pridobivati MC in diferenciranih tkiv z zaželenim genotipom	Možno z uporabo metode SCNT
Ni nevarnosti nastanka teratomov po transplantaciji.	Po transplantaciji nevarnost tvorbe teratomov
Težko je spremeniti epigenetski profil celic.	Epigenetske spremembe so reverzibilne
Niso etično sporne	Etično sporne (različna zakonodaja v različnih državah)
Uporaba: terapije s transplantacijo	Uporaba: 1) terapije s transplantacijo; 2) testiranje farmacevtskih substanc; 3) produkcija gamet in zarodkov; 4) študije človeškega razvoja, kongenitalnih anomalij in raka pri otrocih.
Plastičnost je le delna; opisujejo primere transdiferenciacije mezenhimskih in krvotvornih MC	Popolna plastičnost

Ker izražajo nizko stopnjo telomerazne aktivnosti (telomeraza je encim, ki podaljšuje telomere, konce kromosomov), se jim s staranjem tudi krajšajo telomere in v kulturi postopno zapadejo v senescenco in odmrejo. Po transplantaciji ne predstavljajo nevarnosti nastanka teratomov. Pri EMC lahko za pridobivanje celic z željenim genotipom uporabimo metodo prenosa jedra, pri somatskih MC pa to ni mogoče. Zaradi svojega izvora iz tkiv odraslega človeka niso etično sporne in jih raziskujemo za uporabo v transplantacijskih zdravljenjih.

Po prevladujoči teoriji vsako tkivo vsebuje majhno populacijo MC, ki imajo sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije. Razvoj MC je enosmeren. Z diferenciacijo v zrele celice se zmanjšuje pluripotentnost celice. Mnoge študije so pokazale, da imajo odrasle MC sposobnost diferenciacije tudi v celice drugih tkiv in ne samo v celice tkiva iz katerega izhajajo (plastičnost MC).

2.4 MATIČNE CELICE IZ MAŠČOBNEGA TKIVA

Človeško podkožno maščobno tkivo je potencialen vir odraslih (oz. somatskih) matičnih celic (matične celice iz maščobnega tkiva, ASC, angl. adipose derived stem cells) (Zuk in sod., 2001; Gimble in sod., 2007), ki izhajajo iz EMC. Iz multipotentnih tkivno specifičnih MC se razvijejo predniške celice, ki se delijo in končno diferencirajo v zrele somatske celice organov (Oertel in Shafritz, 2008). Te vključujejo adipocite, hondrocite, krvotvorne podporne (stromalne) celice, hepatocite, nevronom podobne celice, osteoblaste, pankreasne celice in celice skeletnih mišic (Gimble in sod., 2007). Obstajajo tako *in vivo* kot *in vitro* dokazi za multipotentnost ASC (Gimble in sod., 2007).

S povečevanjem števila ljudi s prekomerno telesno težo je podkožno maščobno tkivo izdaten in razmeroma dostopen vir MC. Lipoaspirati predstavljajo odpadno tkivo v liposukcijskih posegih, in se lahko uporabijo za izolacijo MC. Te MC so multipotentne in obetajo široko uporabo v terapevtske namene (Gimble in sod., 2007), morebiti tudi z darovanjem in zbiranjem celic iz odvečne maščobe.

2.4.1 Razvoj in značilnosti maščobnega tkiva

In kako so sploh znanstveniki začeli razmišljati, da se v maščobnem tkivu nahajajo matične celice? K temu so jih napeljale človeške patologije, kot so progresivna kostna heteroplazija (formacija ektopične kosti znotraj podkožnega maščobnega tkiva), lipomi in liposarkomi (tumorji, ki se pojavljajo v podkožnem in visceralem maščevju) ter debelost (Gimble in sod., 2007).

Maščobno tkivo izvira iz mezodermalne plasti zarodka in se razvije pre- in postnatalno. Najzgodnejši mikroskopski dokaz adipocitov (maščobnih celic) pri človeku je drugi trimester nosečnosti. V prašičjih zarodkih so znanstveniki z monklonskimi protitelesi identificirali preadipocite med 50. in 70. dnevom brejosti. To sovpada s pojavom fibroblastnih celic, ki imajo obsežen endoplazemski retikulum, visoko razmerje jedro/citoplazma, perinuklearno lokalizacijo mitohondrija in prisotne lipidne vakuole. Z dozorevanjem adipociti pridobijo multiokularne ali uniokularne zaloge lipidov. Mikroskopska lokacija adipogenih predniških celic še vedno ni čisto jasna. Je pa znano, da imajo adipociti in endotelne celice enake površinske antigene, ki so enakega izvora

(Wright in sod., 1990). Za predniško celico adipocitov je možno dokazati, da je fibroblast kolonjske enote (CFU-F), ki izhaja iz kostnega mozga in se širi po krvnem obtoku. Znanstveniki so odkrili, da se celice podobne CFU-F lahko znotraj ekstramedularnih maščobnih zalog kot odziv na zdravljenje s tiazolidindionom ali na prehrano bogato z maščobami integrirajo in diferencirajo v adipocite.

Preglednica 6: Diferenciacijski potencial MC iz maščobe (Gimble in sod., 2007: 1253)

Celična linija	Induktivni dejavniki
Adipociti	Deksametazon, izobutil metilksantin, indometacin, inzulin, tiazolidinedon
Kardiomiociti	Transferin, IL-3, IL-6, VEGF
Hondrocyti	Askorbinska kislina, kostni morfogenetski protein 6, deksametazon, inzulin, TGF-β
Endotelij	Gojišče EGM-2-MV (Cambrex), ki vsebuje askorbat, epidermalni rastni dejavnik, bFGF, hidrokortizon
Miociti	Deksametazon, konjski serum
Nevronom podobna	Butiliran hidroksianizol, valproična kislina, inzulin
Osteoblasti	Ascorbinska kislina, kostni morfogenetski protein 2, deksametazon, 1,25 dihidroksi vitamin D ₃

Makroskopsko lahko ločimo vsaj 5 različnih tipov maščobnega tkiva: kostni mozeg, rjavo, žlezno, mehansko in belo. Vsako služi drugi biološki funkciji. V kostnem mozgu ima maščobno tkivo aktivno in pasivno vlogo. Naseljuje prostor, ki ni več potreben za hematopoezo in služi kot zaloga energije in vir citokinov za osteogene in krvotvorne dogodke. Rjavo maščobno tkivo je termogeno. Najdemo ga okrog glavnih organov (srce, ledvice, aorta, gonade) v novorojenčku in izgine med odraslanjem. Žlezno maščobno tkivo zagotavlja nutiente in energijo med laktacijo in je delno regulirano s hormoni, povezanimi z nosečnostjo. Mehanske maščobne zaloge zagotavljajo podporo očesu, dlani in drugim kritičnim strukturam. Belo maščobno tkivo je zaloga energije in omogoča izolacijo. Belo in drugo maščobno tkivo ima tudi endokrino vlogo.

Pri miših je multipotentnih MC veliko v belem maščobnem tkivu, med tem ko je njihov diferenciacijski potencial v rjavem maščobnem tkivu zmanjšan. Pri ljudeh so opazne razlike pri pridobivanju MC iz belega maščevja iz različnih delov telesa. Največ se jih pridobi iz maščevja iz roke. Manj se jih dobi iz maščevja iz stegna, trebuha ali prsi. Še vedno je potrebno določiti, iz katerega dela telesa je maščoba najbolj primerna za izločnjo MC.

In vitro se MC iz maščobe podvojijo na 2 do 4 dni, odvisno od gojišča in zaporedne pasaže (Gimble in sod., 2007). Pri pasaži, daljši od 4 mesecev, se začnejo dogajati maligne transformacije (Rubio in sod., 2005). Pri kliničnih produktih iz MC iz maščobe bo potrebno vključiti analize kariotipa ter *in vitro* in *in vivo* teste tumorigenosti.

MC iz maščobe se lahko uporablja v regenerativni medicini. Lahko se jih uporabi na več načinov:

- dostava v poškodovano ali obolelo tkivo, kjer izločajo citokine in rastne dejavnike, ki stimulirajo okrevanje na parakrini način,
- MC iz maščobe modulirajo nišo MC gostitelja s privabljanjem endogenih MC na to mesto in usmerjanjem njihove diferenciacije na željeno pot,
- MC iz maščobe lahko zagotovijo antioksidante, vežejo proste radikale in molekulske spremiševalce (šaperone) / proteine toplotnega šoka na ishemično mesto,
- diferenciacija MC iz maščobe v želeno celično linijo.

V vseh kontekstih bi se MC lahko uporabilo za avtologna ali alogenska zdravljenja. Avtologne MC iz maščobe ponujajo prednosti iz regulatorne, histokompatibilne in infekcijske perspektive. Več študij je pokazalo, da imajo gojene humane MC iz maščobe v nasprotju s svežimi izoliranimi SVF celicami manjše izražanje površinskih histokompatibilnostnih antigenov in ne stimulirajo limfocitne reakcije v sokulti z monociti iz alogenske periferne krvi (McIntosh in sod., 2006). Podobno kot mezenhimske MC iz kostnega mozga tudi MC iz maščobnega tkiva zavirajo imunske reakcije (McIntosh in sod., 2006). Seveda so na tem področju potrebne še dodatne raziskave.

Preglednica 7: Imunofenotip gojenih humanih MC iz maščobe (Gimble in sod., 2007: 1252)

Kategorija označevalca	Pozitivni označevalci	Negativni označevalci
Adhezijske molekule	CD9, CD29, CD49, CD54, CD105, CD166	CD11b, CD18, CD50, CD56, CD62, CD104
Receptorske molekule	CD44, CD71	CD16
Encimi	CD10, CD13, CD73, aldehid dehidrogenaza	
Molekule ekstracelularnega matriksa	CD90; CD146; kolagen tipa I in III; osteopontin; osteonektin	
Citoskelet	α -gladko-mišični aktin, vimentin	
Hematopoetski		CD14, CD31, CD45
Kaskada komplementa	CD55, CD59	
Histokompatibilnostni antigeni	HLA-ABC	HLA-DR
Značilni za matične celice	CD34, ABCG2	
Stromalni	CD29, CD44, CD73, CD90, CD166	

Diferenciacijski potencial MC je prikazan v **Preglednici 6**. Kilroy in sod. (2007) so preučevali hipotezo, da so multipotentne ASC zmožne diferenciacije proti adipocitom, hondrocytom in osteoblastom, za kar so odgovorni citokini, ki nastajajo v maščobnem tkivu. Ob izpostavitvi bFGF ali epidermalnem rastnem dejavniku (angl. epidermal growth factor, EGF), so ASC značilno povečale izločanje hepatocitnega rastnega dejavnika (angl. hepatocyte growth factor, HGF), citokina vpletene v hematopoezo, vaskulogenezo in

oblikovanje mlečnih epitelnih vodov. Askorbinska kislina sinergira s temi induktivnimi dejavniki in še poveča raven HGF. Ob izpostavitvi lipopolisaharidom ASC povečajo izločanje hematopoetskih (granulocite/monocyte, granulocite in makrofage stimulirajoči dejavniki, interlevkin 7) in vnetnih (interlevkini 6, 8 in 11, TNF- α) citokinov. V sokulti s CD34(+) celicami izoliranimi iz popkovnične krvi, so ASC podpirale dolgotrajno hematopoezo *in vitro*. V kratkotrajnih 12-dnevnih sokulturah so ASC vzdrževale in omogočale pomnoževanje mieloidnih in limfoidnih predniških celic. Te ugotovitve so združljive z delovanjem izločenih citokinov in potrjujejo poročila drugih laboratorijev, ki so preiskušali hematopoetsko podporno sposobnost ASC.

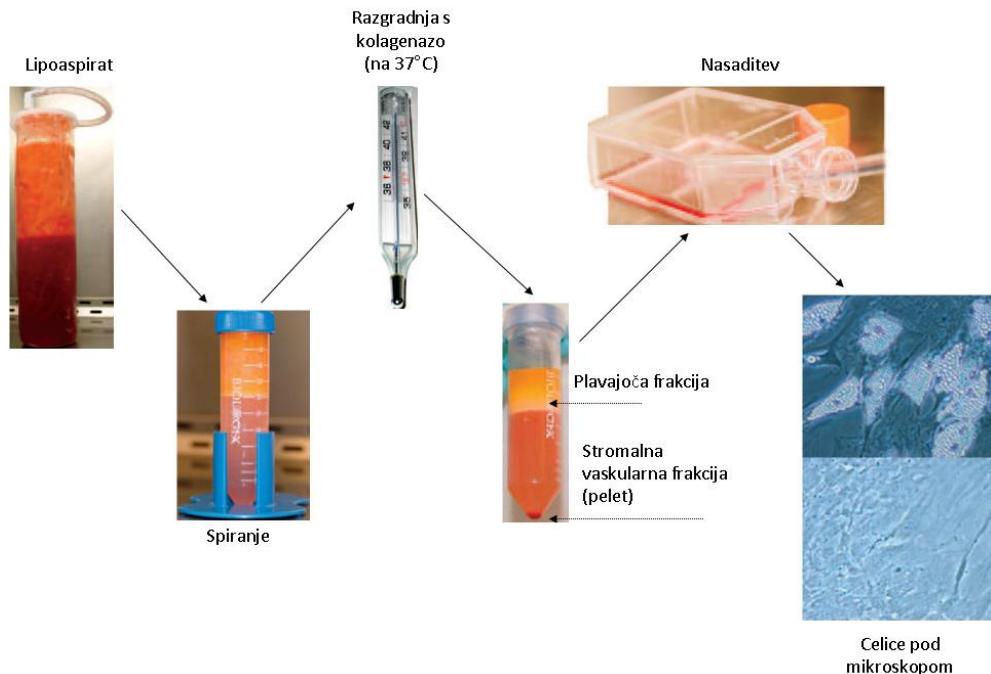
Preglednica 7 prikazuje imunofenotip ASC.

2.4.2 Pridobivanje MC iz maščobnega tkiva

Maščobno tkivo se pridobi z liposukcijo. Plastični kirurgi s kanilo prepojijo podkožno tkivo s fiziološko raztopino, ki vsebuje anestetik in/ali epinefrin in nato s sesanjem odstranijo oboje, tekočino in kose tkiva (Illouz, 1983). Rezultat tega postopka so fino sesekljani koščki tkiva. Njihova velikost je odvisna od dimenzij kanile. Neodvisne študije so pokazale, da sama liposukcijska aspiracija nima pomembnega vpliva na viabilnost izoliranih celic stromalne vaskularne frakcije (angl. stromal vascular fraction, SVF) (Moore in sod., 1995). Adherentne stromalne celice z značilnostmi predniških celic adipocitov lahko najdemo direktno znotraj liposukcijske aspiracijske tekočine, prav tako v SVF pridobljeni iz encimsko obdelanih koščkov tkiva (Yoshimura in sod., 2006). Pri ultrazvočni liposukciji je zmanjšano število pridobljenih celic iz encimsko obdelanih koščkov tkiva in tudi njihova proliferativna kapaciteta je zmanjšana (Oedayrajsingh-Varma in sod., 2006). Izkoristek MC iz maščobnega tkiva se lahko kasneje izboljša s prilagajanjem hitrosti centrifugiranja (Kurita in sod., 2008). Raziskovalci so dosegli optimalni izkoristek celic s hitrostjo centrifugiranja 1200g. To so naredili na osnovi kasnejšega oblikovanja zaloge maščobnega tkiva, pridobljenega iz človeka in implantacije v mišji model z oslabljenim imunskeim sistemom (Kurita in sod., 2008).

Proces izolacije zahteva manipulacijo velikega volumna celic, ki vsebujejo lipide, kar predstavlja potencialno tveganje za inštrumente in osebje. Z namenom olajšanja postopka so številne skupine razvile naprave za avtomatizacijo izolacije celic (Katz in sod., 1999; Katz in sod., 2001). Te bodo morda nekoč komercialno dostopne za uporabo v avtomatizirani manipulaciji maščobnega tkiva in izolaciji celic, primernih za klinične aplikacije, v velikem merilu.

Iz 400-600 mg maščobnega tkiva se lahko pridobimo okoli $5 \cdot 10^5$ ASC (Zhu in sod. 2008). Postopek pridobivanja MC iz lipoaspirata je prikazan na **Sliki 9**. Lipoaspirat se najprej spira, da se odstrani krvotvorne celice. Nato dodamo kolagenazo, po razgradnji se vzorec centrifugira, da se loči plavajoča populacija zrelih adipocitov od SVF. SVF sestavlja heterogena populacija celic, med katerimi so krvne celice, fibroblasti, pericite in endotelne celice kot tudi »preadipocite« oziroma predniške celice adipocitov. Končni izolacijski korak je nasaditev v gojilne posode, kjer se »preadipociti« pritrdijo na dno posode in jih zato lahko ločimo od ostalih celic, ki se ne (postopek po Gimble in sod., 2008).



Slika 9: Postopek pridobivanja MC iz maščobnega tkiva iz lipoaspirata (Gimble in sod., 2007: 1251)

2.4.3 MC iz maščobnega tkiva kot hranilne celice

Zaradi potencialne dostopnosti velike količine odvečne maščobe, ki se po operacijskih posegih zavrže, podobnosti MC iz maščobe MC iz kostnega mozga ter multipotentnega značaja so MC iz maščobe primeren vir za najrazličnejše uporabe. Namen našega dela je bil, da jih poskusimo uporabiti kot hranilno plast za gojenje EMC.

Nobeno poročilo še ne obstaja o uporabi MC iz maščobe za hranilno plast za gojenje EMC.

2.5 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE IZ KOSTNEGA MOZGA

Mezenhimske matične celice (MMC) sta prva opisala Friedenstein in Petrakova leta 1966, Fridenstein je prvi razvil tudi metode za njihovo izolacijo in gojenje (Jackson in sod., 2007).

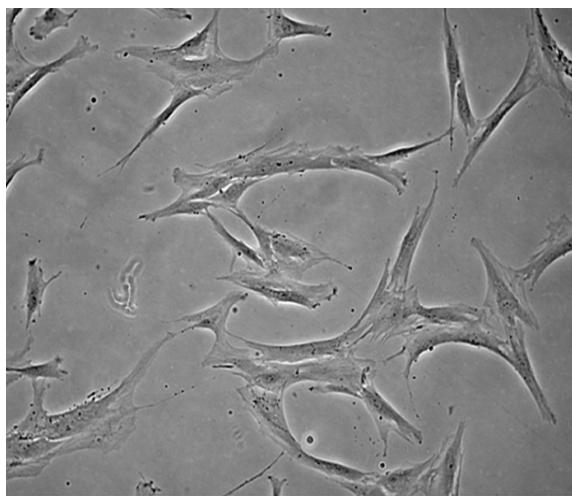
MMC spadajo med stromalne celice kostnega mozga (KM) in imajo dvojno vlogo:

- predstavljajo izvorne celice za ne-krvotvorna tkiva in hkrati
- hranilne celice za podporo rasti in diferenciacije krvnih celic in ostalih tkiv,

saj sintetizirajo različne komponente zunajceličnega matriksa in različne rastne dejavnike. So torej zelo pomembne pri ustvarjanju niše krvotvornih MC (KMC), dokazali pa so tudi, da izboljšujejo preživetje KMC pri presaditvi (Locatelli in sod. 2007). MMC se poleg KM nahajajo tudi v drugih tkivih: popkovnični krvi, fetusnih jetrih, fetusnih pljučih, amnionski tekočini, periferni krvi, zobeh, kožnem tkivu in maščobnem tkivu (Jackson in sod., 2007).

MMC so multipotentne in lahko *in vitro* diferencirajo v celice mezodermalne linije (osteoblaste, adipocite, hondrocite, mišične celice). Ugotovljeno je bilo tudi, da se lahko pod določenimi eksperimentalnimi pogoji diferencirajo tudi v celice drugih linij, npr. nevralne celice. MMC predstavljajo 0,001-0,01 odstotka mononuklearnih celic v humanem KM (Locatelli in sod., 2007).

MMC so v kulturi vretenaste oblike. Odvisno od tkiva, iz katerega izhajajo in pogojev v kulturi, lahko izražajo tudi: CD349, SSEA-4, Oct-4, Nanog-3 in Nestin (Buhring in sod., 2007).



Slika 10: Mezenhimske matične celice v kulturi (Dr. W. Eustace..., 2009)

Mnogi opozarjajo, da načini izolacije MMC niso idealni in da je v kulturi še vedno opaziti heterogeno populacijo celic in sicer majhne okrogle celice med fibroblastnimi MMC. Zato se pojavljajo dvomi o diferenciacijski sposobnosti MMC in o njihovi domnevni plastičnosti (Jackson in sod., 2007).

Humane MMC tudi po daljšem gojenju v kulturi ohranijo svojo diferenciacijsko sposobnost, so enostavno dostopne in niso etično sporne, zato so primerne za mnoge aplikacije s področja regenerativne medicine.

MMC se lahko diferencirajo proti osteogenim, hondrogenim, adipogenim in tenocitnim linijam. Majumdar in sod. (2000) so določili izražanje genov za citokine in rastne dejavnike. MMC konstitutivno izražajo mRNA za interlevkine IL-6, IL-11, LIF, spodbujevalni dejavnik rasti kolonij makrofagov (angl. macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) in »stem cell« dejavnik (SCF). MMC obdelane z IL-1 α so povečale izražanje mRNA za IL-6, IL-11 in LIF ter so začele izražati zaznavno raven spodbujevalnega dejavnika rasti kolonij granulocitov (angl. granulocyte colony-stimulating factor G-CSF) in spodbujevalnega dejavnika rasti kolonij garnulocitov in makrofagov (angl. granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF). Ravni mRNA za M-CSF in SCF se niso spremenile. MMC gojene v osteogenem gojišču so se diferencirale vzdolž osteogene linije in zmanjšale nivoje mRNA za IL-6, IL-11 in LIF, medtem ko je bilo izražanje M-CSF in SCF nespremenjeno ter G-CSF in GM-CSF sta ostala nezaznavna. IL-3 ni bil zaznan v kulturi MMC pod nobenimi pogoji. MMC, ki so bile gojene v kontrolnem IL-1 α ali osteogenem gojišču so ohranile podobno kapaciteto za podporo

dolgotrajne »culture initiating« celice (angl. long-term culture initiating cell, LT-CIC). Primarne in osteogeno diferencirane MMC proizvajajo pomembne citokine in podpirajo hematopoezo v dogotrajnih kulturah, kar nakazuje, da te celice zagotavljajo odlično *ex vivo* okolje za hematopoezo med pomnoževanjem predniških celic in so lahko pomembne tudi za *in vivo* terapijo.

2.5.1 Pridobivanje MMC iz kostnega mozga

Pri izolaciji lahko uporabimo več pristopov. Tradicionalno se izkorišča njihova sposobnost pritrditve na plastiko gojilnih posod, s presajanjem celic v kulturi pa se nato zmanjšuje njihova heterogenost (Jackson in sod., 2007). Danes se za izolacijo vedno bolj izkorišča označevalce značilne za ta tip celic. Zanekrat še ni znanega specifičnega označevalca, ki bi ga lahko uporabili za njihovo neposredno izolacijo, zato se izkorišča različne predlagane skupine označevalcev, da na koncu pridobimo čim bolj homogeno populacijo MMC. Celice so negativne za krvotvorne označevalce CD14, CD34 in CD45 in pozitivne za številne adhezijske molekule, ki vključujejo CD73 (SH3, SH4), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2), CD166 (ALCAM) (Locatelli in sod., 2007). označevalci, ki jih različne skupine raziskovalcev uporabljajo za izolacijo MMC frakcije iz humanega kostnega mozga, vključujejo poleg zgoraj naštetih še: CD13, CD29, CD31, CD44, CD54, CD63, CD106, CD140b in Stro-1. MMC izražajo nizko stopnjo HLA molekul razreda I in ne izražajo HLA molekul razreda II. Primerjava označevalcev, ki jih uporabljajo različne skupine, je pokazala, da večina izborov vključuje CD29 in/ali CD105, še vedno pa ni nekega spošnega konsenza o optimalni kombinaciji označevalcev MMC (Jackson in sod., 2007). Kolf in sodelavci predlagajo uporabo Stro-1 označevalca v kombinaciji z drugimi npr. s CD73 in CD106 (Kolf in sod. 2007). Mednarodno društvo za celično terapijo (angl. International Society for Cellular Therapy, ISCT) predлага tri kriterijie za izolacijo in karakterizacijo MMC: a) adherenca na plastiko, b) pozitivni označevalci CD105, CD73, CD90, negativni CD45, CD34 in označevalci za monocite, makrofage in B celice in c) celice morajo biti sposobne diferenciacije v vsaj osteoblaste, adipocite in hondroblaste pod standardnimi *in vitro* pogoji (Kolf in sod., 2007).

BMSC se izolirajo in namnožijo iz aspirata kostnega mozga. Goji se jih v DMEM gojišču z 10% FBS in v nekaterih primerih 1 ng/mL bFGF, 0,1mM neesencialnih aminokislin, 1% Pen-Strep-om in 0.2% Fungizonom (sestava se razlikuje med študijami) (Pittenger in sod., 1999).

V gojilne posode jih nasajamo z gostoto $2 \cdot 10^5$ celic/cm². Nepritrjene celice se ob menjavi gojišča sperejo. Ostanejo celice BMSC (pritrjene), ki se jih goji do 80% konfluence (pasaža 0), tripsinizira in zamrzne. Nadaljnja namnoževanja potekajo pri začetni gostoti $5 \cdot 10^3$ celic/cm² v namnoževalnem gojišču (Marolt in sod., 2006).

2.5.2 MMC iz kostnega mozga kot hrailne celice

Ker MMC sintetizirajo različne komponente zunajceličnega matriksa in različne rastne dejavnike ter so zelo pomembne pri ustvarjanju niše KMC *in vivo*, so primerne za uporabo kot hrailne celice za EMC (Cheng in sod., 2003).

2.6 PRIMERJAVA ASC Z MMC IZ KM

Diferenciacijski potencial ASC je podoben diferenciacijskemu potencialu MMC iz KM. Podobnosti med obema tipoma celic segajo do biokemijskega nivoja.

Preglednica 8: Primerjava citokinov, ki jih izločajo ASC in MMC iz KM (Kilroy in sod, 2007: 708)

Citokini	ASC	MMC
Angiogeni		
HGF	+ (E)	+ (R)
VEGF	+ (E)	+ (E)
Krvotvorni		
Flt-3 ligand	+ (R)	+ (R)
G-CSF	+ (E, R)	+ (R)
GM-CSF	+ (E, R)	+ (R)
IL-7	+ (E)	+ (R)
IL-12	- (E)	+ (R)
M-CSF	+ (E,R)	+ (R)
SCF	še ni narejeno	+ (R)
Vnetni		
IL-1 α	- (E)	+ (R)
IL-6	+ (E,R)	+ (R)
IL-8	+ (E,R)	+ (R)
IL-11	+ (E)	+ (R)
LIF	+ (R)	+ (R)
TNF α	+ (E)	+ (R)
+, prisoten; -, odsoten; E, ELISA test; R, RNA test		

Direktna primerjava med imunofenotipi humanih MC iz maščobe in humanih mezenhimskih MC je pokazala več kot 90% podobnost (Gimble in sod., 2007). Npr. v površinskih proteinih, ki sodelujejo pri pritrjanju krvotovornih celic (CD9, CD29 in CD44) (Kilroy in sod., 2007). Še vedno pa so prisotne razlike v izražanju površinskih proteinov. Npr. glikoprotein CD34 je prisoten na humanih MC iz maščobe v zgodnjih pasažah, med tem ko na mezenhimskih MC ni prisoten. Identifikacija površinskega imunofenotipa MC iz maščobe (**Preglednica 7**) je omogočila mehanizem za pridobivanje bolj čiste populacije MC direktno iz heterogenih celic stromalne vaskularne frakcije (SVF). Raziskovalci so uporabili imunomagnetne značke ali pretočno citometrijo za pozitivno in tudi negativno selekcijo subpopulacij celic znotraj SVF (Gimble in sod., 2007).

S tehniko mikromrež so različni laboratoriji analizirali transkriptome nediferenciranih humanih MC iz maščobe in mezenhimskih MC iz kostnega mozga. Analiza 28 genov ni bila znatno različna med dvema celičnima tipoma. MC iz maščobe in mezenhimske MC izražajo označevalce povezane z MC, vključno s Oct-4, Rex-1 in Sox-2 (Izadpanah in sod., 2006).

Proteom humanih MC iz maščobe ima skupne lastnosti s fibroblasti, mezenhimskimi MC in drugimi linijami. Direktna primerjava proteomov MC iz maščobe in mezenhimskih MC je temeljila na 2D gelski elektroforezi (Izadpanah in sod., 2006).

Zaključimo lahko tudi, da ASC izločajo podobne citokine kot MMC iz KM. Npr. proinfalamatorne citokine, vključno z IL-6, M-CSF in druge CSF dejavnike (**Preglednica 8**) (Kilroy in sod., 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI IN APARATURE

3.1.1 Materiali

ASC smo dobili iz laboratorija prof. dr. Jeffreya M. Gimbla (Pennington Biomedical Research Center, Baton Rouge, Luisiana, ZDA). Prejeli smo zamrznjene ASC, ki so bile izolirane iz maščobnega tkiva. Izolacija je opisana v poglavju 2.3.3 Pridobivanje MC iz maščobnega tkiva po objavljenih protokolih (Gimble in sod., 2008).

Embrionalne matične celice linije H13 so bile pridobljene z inštituta Wicell (Wisconsin). Podatki o celični liniji so na spletni strani inštituta (WA13..., 2009).

MMC za primerjave so bile pridobljene iz podjetja Cambrex (East Rutherford, New Jersey, ZDA). Izolirane in namnožene so bile iz aspirata kostnega mozga (50 mL) moškega donorja, starega 25 let. Uporabljali smo celice primarne kulture (P0), ki smo jih odmrznili in gojili v MEF gojišču. Pridobivanje MMC je opisano v poglavju 2.4.1 Pridobivanje MMC iz kostnega mozga.

Celice MEF so bile pridobljene iz podjetja Millipore (Billerica, Massachusetts, ZDA), kataloška številka »PMEF-CF EmbryoMax® Primary Mouse Embryo Fibroblasts, Strain CF1, Mytomycin C treated, passage 3« (5 zamrzovalnih stekleničk).

Vse uporabljene kemikalije so navedene v **Preglednici 9**.

Uporabljali smo gojilne posode podjetja Nunclon (tako imenovane »delta dishes«), naročene preko podjetja Fischer Scientific (**Preglednica 10**).

Za PCR v realnem času smo uporabljali MicroAmp™ optične reakcijske plošče s 96 vdolbinicami s črtno kodo (»MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode«; Applied Biosystems, kataloška številka: 4306737).

Preglednica 9: Seznam vseh uporabljenih kemikalij

Okrajšava	Celo ime	Podjetje	# proizvoda
DMEM gojišče	Dulbeccovo modificirano gojišče (»Dulbecco's modified Eagle medium«)	Invitrogen	11965
KO-DMEM gojišče	»Knock-out« Dulbeccovo modificirano gojišče	Invitrogen	10829
RPMI gojišče	Gojišče »Roswell Park Memorial Institute«	Invitrogen	11835
HI-serum (FBS)	Toplotno inaktiviran serum (»heat-inactivated serum«)	Invitrogen	10082
KO-serum	»Knock-out« serum (»knock-out serum«)	Invitrogen	10828

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Neesencialne aminokisline	Neesencialne aminokisline	Invitrogen	11140
L-glutamin	L-glutamin	Invitrogen	25030-081
β-merkaptoetanol	β-merkaptoetanol	Invitrogen	21985-023
bFGF	Bazični fibroblastni rastni dejavnik (»basic fibroblast growth factor«)	Invitrogen	13256-029
Tripsin	Tripsin z EDTA	Invitrogen	25200
Kolagenaza	Kolagenaza	Invitrogen	17104-019
Mitomicin C	Mitomicin C	Sigma	M4287-2MG
PBS – MgCl ₂ , CaCl ₂ 1x	Slana fosfatna puferska raztopina (»Phosphate Buffered Saline«) brez MgCl ₂ in CaCl ₂	Invitrogen	14190
Tripansko modriло	Tripansko modriло (»Trypan Blue Solution«)	Sigma	T8154
DMSO	Dimetil sulfoksid (»Dimethyl sulfoxide«)	Sigma	D2438
Želatina	Želatina iz svinjske kože, tip A, prah, testirano s celičnimi kulturami (»Gelatin from porcine skin, Type A, powder, cell culture tested«)	Sigma	G18 90 - 100 g
Fiksativ brez formalina	Fiksativ brez formalina (»Formalin-free Fixative«)	Accustain	A5472
PBS 10x	Slana fosfatna puferska raztopina (»Phosphate Buffered Saline«)	Invitrogen	70011
Triton	Triton X-100	Sigma-Aldrich	X100-500ML
Normalni konjski serum	Normalni konjski serum (»Normal Horse Serum«)	Vector	S-2000
Protitelesa proti SSEA-1	Protitelesa proti »Stage-specific Embryonic Antigen-1«	Vsa iz kompleta »ES Cell Characterization Kit«	SCR001
Protitelesa proti SSEA-4	Protitelesa proti »Stage-specific Embryonic Antigen-4«		
Protitelesa proti Tra-1-60	Protitelesa proti »Terato Related Antigen-1-60«		
Protitelesa proti Tra-1-81	Protitelesa proti »Terato Related Antigen-1-81«		

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Protitelesa proti kolagenu tipa I	Mišja protitelesa proti kolagenu tipa I	Abcam	ab6308-100
Protitelesa proti kolagenu tipa IV	Mišja protitelesa proti kolagenu tipa IV	Thermo/ LabVision	MS-747
Protitelesa proti fibronektinu	Kunčja protitelesa proti fibronektinu	Neomarker	RB-077
Protitelesa proti lamininu	Kunčja protitelesa proti lamininu	Thermo/ LabVision	RB-082
Protitelesa proti mišjim prititelesom	Kozja protitelesa proti mišjim prititelesom označena s fluorom (»Gt x Ms IgG/IgM Fluor«)	Chemicon International	92590
Protitelesa proti kunčjim prititelesom	Kozja protitelesa proti kunčjim prititelesom označena s fluoresceinom »Fluorescein Goat Anti-rabbit IgG (H+4)«	Vector	FI-1000
Protitelesa proti kozjim prititelesom	Osličja protitelesa proti kozjim prititelesom označena s fluorokromom (»Donkey Anti-Goat IgG NL-493 Affinity Purified PAb; NorthernLights 493 Fluorochrome-labeled Antibody, X Absorbed«)	R&D Systems	NL003
Faloidin	Faloidin (»Alexa Fluor 555 Phalloidin«)	Invitrogen	A34055
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindole, dilaktat (DAPI, dilaktate)	Invitrogen	D3571
XTT komplet	Komplet za toksikološko testiranje, ki temelji na tetrazolijevi komponenti – XTT-ju (» <i>In vitro</i> Toxicology Assay Kit XTT Based«)	Sigma	TOX-2
Raztopina za zmanjšanje ozadja	Raztopina za protitelesa s komponentami za zmanjšanje ozadja (»Antibody Diluent with Background Reducing Components«)	DakoCytomation	S3022
»Mounting« medij	»Mounting« medij (»Dako Fluorescent Mounting Medium«)	DakoCytomation	S3023
Komplet za določanje koncentracije RNA	»Quant-iT RNA Assay Kit«	Invitrogen	Q10210
Komplet za reverzno transkripcijo	Komplet za reverzno transkripcijo »SuperScript III First-Strand«	Invitrogen	18080-051
Komplet za izolacijo RNA	Komplet za izolacijo RNA »RNeasy Mini Kit«	Qiagen	74104
Sprej proti RNazam	Sprej proti RNazam »RNase Zap«	Ambion	AM9780; AM9782

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Endogena kontrola za GAPDH	Humana GAPD (GAPDH) endogena kontrola (»Human GAPD (GAPDH) Endogenous Control (VIC/TAMRA Probe, Primer Limited)«)	Applied Biosystems	4310884E
»TaqMan® Universal PCR Master Mix«	Osnovna PCR mešanica za TaqMan (»TaqMan® Universal PCR Master Mix«)	Applied Biosystems	4304437
Komplet za zaznavanje Oct-4 (Pou5f1)	»ASSAY-ON-DEMAND Hs00742896_s1«	Applied Biosystems	4331182
Komplet za zaznavanje Sox-2	»ASSAY-ON-DEMAND Hs00602736_s1«	Applied Biosystems	4331182
Komplet za zaznavanje Pax-6	»ASSAY-ON-DEMAND Hs00240871_m1«	Applied Biosystems	4331182
Komplet za zaznavanje Sox-17	»ASSAY-ON-DEMAND Hs00751752_s1«	Applied Biosystems	4331182
Komplet za zaznavanje Brachyury	»ASSAY-ON-DEMAND Hs00610080_m1«	Applied Biosystems	4331182
»GAPDH TaqMan Universal Endogenous Control«	»GAPDH TaqMan Universal Endogenous Control«	Applied Biosystems	4310884E
TaqMan® sonda za zaznavanje Nanog	»TaqMan® MGB Probe, NANOG, FAM« 5-ATGCAGGCACTCA-3	Applied Biosystems	4316034
Začetni oligonukleotid 1 za zaznavanje Nanog	»Sequence detection primer, NANOG, forward« 5-TGAGCTGGTTGCCTCATGTTAT-3	Applied Biosystems	4304970
Začetni oligonukleotid 2 za zaznavanje Nanog	»Sequence detection primer, NANOG, reverse« 5-GAAGGAAAAGTATCAAGAAATTGGGATA-3	Applied Biosystems	4304970

Preglednica 10: gojilne posode

Gojilna posoda	Kataloška številka
Plošča s 4 vdolbinami	12-565-72 (Fisher Scientific), 176740 (Nunclon)
Plošča s 6 vdolbinami	14-832-11 (Fisher Scientific), 140675 (Nunclon)

3.1.2 Gojišča in ostale raztopine

Pri raziskovalnem delu smo uporabili naslednja gojišča, navedena v **Preglednici 11**.

Preglednica 11: Sestava uporabljenih gojišč

Gojišče 1 ali MEF gojišče	90% DMEM z visoko vsebnostjo glukoze 10% toplotno inaktiviranega serum
Gojišče 2	90% DMEM z visoko vsebnostjo glukoze 10% KO-serum
Gojišče 3	80% DMEM z visoko vsebnostjo glukoze 20% KO-serum
Gojišče 4	80% DMEM z visoko vsebnostjo glukoze 20% KO-serum + 500 µl neesencialnih aminokislin, 250 µl L-glutamina, 100 µl β-merkaptoetanola in 25 µl bFGF (količine so za končni volumen 50 ml)
Gojišče 5 ali hEMC gojišče	80% KO-DMEM z visoko vsebnostjo glukoze 20% KO-serum + 500 µl neesencialnih aminokislin, 250 µl L-glutamina, 100 µl β-merkaptoetanola in 25 µl bFGF (količine so za končni volumen 50 ml)

V Preglednici 12 so navedene ostale raztopine.

Preglednica 12: Ostale raztopine

Raztopina tripsina	0.25%
Raztopina kolagenaze	1 mg/ml KO-DMEM
Raztopina mitomicina C	8 mg/ml DMEM
Raztopina želatine	0.1% v deionizirani vodi

3.1.3 Aparature

Pri izvedbi raziskovalnega dela smo uporabili aparature, navedene v Preglednici 13.

Preglednica 13: Aparature, ki smo jih uporabili pri izvedbi raziskovalnega dela

Aparatura	Podjetje
Centrifuga, model 5804R, model 5415R	Eppendorf
Inkubator Heracell 150	Thermo/Fischer Scientific
Svetlobni mikroskop CKX31	Olympus
Fazno kontrastni fluorescentni mikroskop, model IX81	Olympus
Avtomatske pipete 1-10 µl, 10-100 µl in 100-1000 µl	Eppendorf

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

Pipetor	Drummond
Fluorometer, model 1.23	Qubit
Vodna kopel Isotemp 210	Fischer Scientific
Aparatura za PCR v realnem času, model HT7900	Applied Biosystems
Aparatura za PCR, model MyCycler	BioRad
Spektrofotometer SpectraMax Plus	Molecular Devices
Mešalo	Fischer Scientific
Avtoklav, model 2540E	Tuttnauer Brinkmann

3.2 POSTOPKI GOJENJA IN SHRANJEVANJA ASC IN MMC CELIC

3.2.1 Odmrzovanje celic

Zamrzovalno stekleničko s celicami smo vzeli iz tekočega dušika in jo takoj potopili v vodno kopel s temperaturo 37°C. Ko se je videlo le še majhen kristalček ledu v zamrzovalni steklenički, smo jo prenesli v sterilno komoro. Celice smo odpipetirali v 50 ml epruveto in dodali 19 ml gojišča (gojišče za MEF). Sledilo je centrifugiranje na 250 x g za 5 min. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in usedlino celic resuspendirali v svežem gojišču (12 ml/T75). Nato smo celice nasadili v 75 cm² (T75) gojilne posode in jih prenesli v inkubator.

3.2.2 Menjava gojišča

Celice smo gojili v inkubatorju pri temperaturi 37°C, v atmosferi s 5% CO₂ in jim menjali gojišče dvakrat tedensko (ali pa na 3-4 dni – po potrebi). To smo storili tako, da smo odsesali staro gojišče in dodali sveže (na gojilno posodo T75 gre 12 ml gojišča).

3.2.3 Presajevanje celic

Rast celic smo redno spremljali z opazovanjem pod svetlobnim mikroskopom. Ko so celice v gojilnih posodah dosegle konfluentno stanje, smo jih presadili. Celicam smo odsesali gojišče, jih sprali z 10 ml pufra DPBS – MgCl₂, CaCl₂ 1x (za T75) in jim dodali 3 ml tripsina (0,25%) in 5 min inkubirali pri 37°C. Po 5 minutah smo v gojilne posode s tripsinom dodali enak volumen gojišča za MEF (važno je, da vsebuje FBS), s katerim smo inaktivirali tripsin. Vsebino gojilnih posod smo resuspendirali do suspenzije posamičnih celic in jo prenesli v 50 ml epruveto. Celično suspenzijo smo centrifugirali pri 250 x g za 5 min. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in usedlino celic resuspendirali v svežem gojišču volumen. Celice smo prešteli in jih razredčili na želeno koncentracijo. Celice smo nasadili v nove gojilne posode pri gostoti 6000-7000 celic/cm² in jih prenesli v inkubator.

3.2.4 Štetje celic pod mikroskopom

Celice smo šteli s pomočjo števne komore. Vzorec celične suspenzije smo obarvali s tripanskim modrilirom, ki obarva mrtve celice. Po potrebi smo celično suspenzijo predhodno redčili z gojiščem. Iz števila preštetih živih celic smo izračunali celokupno število živih celic v vzorcu. Šteli smo pod svetlobnim mikroskopom Olympus CKX31.

3.2.5 Zamrzovanje celic

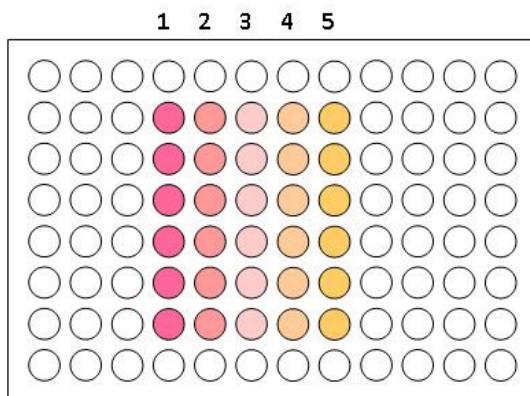
Najprej smo pripravili raztopino za zamrzovanje (80% HI-serum + 20% DMSO). Ko smo dodajali DMSO smo mešali, da ne bi precipitiral. Pripravljeno raztopino smo prefiltirali in spravili v hladilnik.

Celice smo centrifugirali in usedlino resuspendirali v MEF gojišču. Raztopino za zamrzovanje smo vzeli iz hladilnika in jo po kapljicah dodajali v epruvete s celicami (enak volumen kot smo prej dodali MEF gojišča). Vmes smo krožili z epruveto, da smo zagotovili mešanje. Hitro smo odpipetirali po 1 ml pripravljenih celic v pripravljene zamrzovalne stekleničke. Nato smo dali zamrzovalne stekleničke s celicami v posodo za zamrzovanje, ki se ohlaja 1°C/minuto in jo odnesli v zamrzovalnik s temperaturo -80°C. Ko so se celice ohladile na -80°C, smo jih prenesli v tekoči dušik.

3.3 KARAKTERIZACIJA RASTI ASC IN MMC CELIC IN SINTEZE EKSTRACELULARNIH PROTEINOV

3.3.1 Ugotavljanje rasti celic v različnih gojiščih

Za rastno krivuljo smo nasajali celice v ploščo s 96 vdolbinicami. Nasajali smo jih z gostoto 1000 celic/vdolbinico (to je na 150 µl gojišča). Celice smo nasajali v gojišču za MEF. Nasadili smo 5 vrstic po 6 vdolbinic (**Slika 11**). Nasajene plošče smo dali v inkubator. Naslednji dan smo 4 vrsticam zamenjali gojišče, v eni pa smo pustili gojišče za MEF.



Slika 11: Shema nasajene plošče za rastno krivuljo s petimi različnimi gojišči

Gojišča, ki smo jih uporabili: Gojišča 1-5.

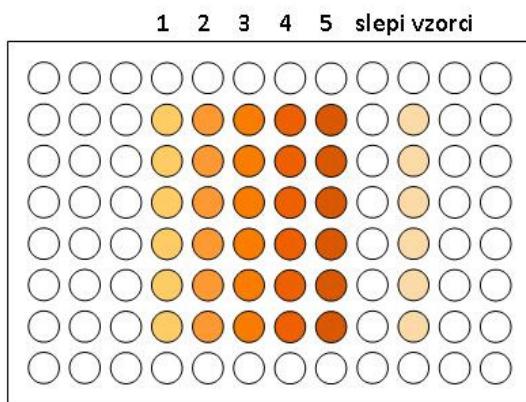
Takšna gojišča smo pripravili, ker smo opazili, da se morfologija celic ASC in MMC po menjavi gojišča iz gojišča za MEF na gojišče za hEMC spremeni. Zanimalo nas je, če se spremeni tudi hitrost rasti celic, ter katera je tista komponenta gojišča za hEMC, ki bi lahko vplivala na to spremembo (opomba: spremembe hitrosti rasti v hrailnih plasteh nismo mogli opaziti, ker so bile inaktivirane).

3.3.2 XTT test

Test smo opravili s kompletom »*In Vitro* Toxicology Assay Kit XTT Based«. Ta komplet omogoča spektrofotometrično določanje števila celic preko mitohondrijske aktivnosti živih celic. XTT test je preprost, natančen in daje zanesljive rezultate. Ključna komponenta je natrijeva sol (2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolijeva-5-karboksianilidna inertna sol) ali XTT. Raztopino XTT, smo pripravili v gojišču RPMI, ki ne vsebuje fenol rdečega. Raztopina je rumenkaste barve. Mitohondrijske dehidrogenaze v živih celicah cepijo tetrazolijev obroč XTT in pri tem nastajajo oranžni kristali formazana, ki so topni v vodni raztopini. Oranžno raztopino, ki je nastala, smo merili spektrofotometrično. V test smo vključili tudi slepe vzorce brez celic.

Postopek izvedbe testa:

1. Kulture, nasajene za rastno krivuljo, smo vsak drugi dan vzeli iz inkubatorja in jih prenesli v sterilno komoro.
2. XTT iz ene zamrzovalne stekleničke smo raztopili v 5 ml gojišča RPMI. Iz raztopljenega XTT smo pripravili 20% raztopino, ki smo jo uporabili za test.
3. Iz kultur smo odstranili gojišča in v vsako vdolbinico dodali 100 µl raztopine XTT. V vsaki plošči s 96 vdolbinicami smo pripravili tudi 6 slepih vzorcev (**Slika 12**).



Slika 12: Shema testa XTT po inkubaciji

4. Kulture smo vrnili v inkubator za 2 uri in pol.
5. Po 2 urah in pol smo jih vzeli iz inkubatorja in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm.

6. Iz izmerjenih vrednosti absorbance pri 450 nm smo narisali grafe odvisnosti logaritma absorbance pri 450 nm od dneva gojenja kulture.

3.3.3 Nasajanje celic za barvanje ekstracelularnega matriksa

Za barvanje ekstracelularnega matriksa smo nasajali inaktivirane celice. Nasajali smo jih z gostoto 300.000 celic na ploščo s 4 vdolbinami, torej 75.000 na vdolbino. Ena cela plošča s 4 vdolbinami približno ustreza 1 vdolbini v plošči s 6 vdolbinami (ta ima površino 9,6 cm²).

V vdolbine smo najprej dali sterilna objektna stekelca in jih prevlekli z raztopino želatine (0,1% v deionizirani vodi). Celice smo nasajali v gojišču za MEF. Nasajene plošče smo prenesli v inkubator. Naslednji dan smo polovici plošč zamenjali gojišče, in sicer smo jim odsesali gojišče za MEF in jim dodali gojišče za hEMC, ter jih prenesli v inkubator za 1-2 dni.

3.3.4 Ugotavljanje proteinov ekstracelularnega matriksa

Princip ugotavljanja proteinov ekstracelularnega matriksa je imunofluorescentno barvanje (**Slika 7**), to je barvanje s fluorescentno označenimi protitelesi.

Skozi celoten postopek mora biti zagotovljena primerna vlažnost, da se celice ne izsušijo. Mi smo to zagotovili z obdajanjem plošč z mokrimi papirnatimi brisačami. Od dodatka sekundarnih protiteles naprej je pomembno tudi, da prostor zatemnimo, da zaščitimo fluorescentne značke.

1. Celicam smo odstranili gojišče.
2. Da bi preprečili razgradnjo proteinov, smo jih fiksirali. Za to smo uporabili fiksativ brez formalina. V fiksativu smo jih pustili 20 min.
3. Odstranili smo fiksativ in sprali celice s pufrom 1x PBS (10x redčen 10x PBS).
4. Ker smo barvali tudi aktinske filamente (stresna vlakna) in jedra, ki se nahajajo znotraj celic, smo morali naluknjati celično membrano. To smo storili z raztopino 0,1% tritonu v 1x PBS. Po 10 minutah smo celice sprali z 1x PBS.
5. Celice smo 30 minut blokirali z 10% normalnim konjskim serumom v 1x PBS.
6. Pripravili smo raztopino primarnih protiteles z raztopino za zmanjšanje ozadja. Uporabili smo protitelesa proti kolagenu I (mišja), fibronektinu (kunčja) in lamininu (kunčja). Vsa protitelesa smo redčili v razmerju 1:100 (protitelo : raztopina za zmanjšanje ozadja).
7. Celice smo prekrili s protitelesom in inkubirali na sobni temperaturi 1 uro.
8. Potem smo odstranili primarno protitelo in 3-krat sprali z 1x PBS.
9. Pripravili smo raztopine sekundarnih protiteles z raztopino za zmanjšanje ozadja. Uporabili smo protitelesa proti mišjim protitelesom in protitelesa proti kunčjim

protitelesom. Oboja smo redčili v razmerju 1:200 (protitelo : raztopina za zmanjšanje ozadja).

10. Celice smo prekrili s protitelesi in jih inkubirali pri sobni temperaturi 30 minut.
11. Od uporabe sekundarnih protiteles (označena s fluorescentno značko) naprej mora ves postopek potekati v zatemnjem prostoru.
12. Po 30 minutah smo odstranili sekundarna protitelesa in 2- do 3-krat sprali z 1x PBS.
13. Nato smo pobarvali aktinske filamente. Pripravili smo raztopino 1,5% normalnega konjskega seruma, 0,1% tritona in faloidina v razmerju 1:200 v 1x PBS. S tem smo prekrili celice in inkubirali 20 minut. Po koncu smo celice 2- do 3-krat sprali z 1x PBS.
14. Pri zadnjem spiranju smo v 1x PBS dodali DAPI (v razmerju 1:500), ki obarva jedra. Celice smo inkubirali 1-2 minuti in ponovno sprali z 1x PBS.
15. Nato smo dobro odstranili PBS in stekelca s celicami prenesli na objektna stekelca. Na objektna stekelca smo najprej kanili »mounting« medij, nato smo nanj previdno položili stekelca s celicami, da ne bi nastali zračni mehurčki. Stekelca smo pokrili še s krovnimi stekelci. Ta smo zatesnili s prozornim lakom za nohte in jih v temnem prostoru posušili.

3.3.5 Opazovanje pobarvanega ekstracelularnega matriksa pod fluorescentnim mikroskopom

Pobarvane komponente ekstracelularnega matriksa smo opazovali pod fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom Olympus IX81 pod 100- in 200-kratno povečavo.

3.4 RAST EMBRIONALNIH MATIČNIH CELIC NA HRANILNIH PLASTEH ASC

3.4.1 Inaktivacija celic z mitomicinom C in priprava hranih plasti

Celicam smo odsesali gojišče in jim dodali 8 ml mitomicina C (8 mg/ml DMEM) ter jih prenesli v inkubator za 2 do 2 uri in pol. Po končani inkubaciji smo odsesali raztopino mitomicina C in nadaljevali s postopkom, ki je enak kot pri presaditvi celic, le da smo celice trikrat sprali s pufom DPBS – MgCl₂, CaCl₂ 1x. Po štetju in redčenju do želene koncentracije smo celično suspenzijo uporabili za pripravo hranih plasti za gojenje embrionalnih matičnih celic.

Za pripravo hranih plasti smo nasadili celice pri gostoti 55.000 celic/cm² v plošči s 6 vdolbinami (površina ene vdolbine je ~9,6 cm²), ki so bile predhodno prevlečene z želatino. Celice smo nasajali v gojišču za MEF. Nasajene plošče smo prenesli v inkubator. Celice smo inkubirali v gojišču za MEF do nasaditve embrionalnih matičnih celic oz. do testiranja sinteze proteinov ekstracelularnega matriksa v gojišču za hEMC.

Naslednji dan smo jim zamenjali gojišče, in sicer smo odsesali gojišče za MEF in jim dodali gojišče za hEMC.

3.4.2 Nasaditev, gojenje in presajevanje hEMC

1. 30 minut pred odtajanjem smo zamenjali gojišče v gojinih posodah prekritih s hraničnimi plastmi. Uporabljali smo plošče s 6 oz. 4 vdolbinami. V vsako vdolbino smo dodali 2 oz. 0,5 ml ogretega gojišča za hEMC.
2. Vzeli smo zamrzovalno stekleničko z hEMC iz tekočega dušika.
3. Čim hitreje smo odmrznili celice v vodni kopeli s temperaturo 37°C (~ 2 min). Pri tem smo pazili, da voda ne doseže pokrovčka.
4. Ko je v zamrzovalni steklenički ostal samo še majhen kos ledu, smo poškropili zunanjost z etanolom in zamrzovalne stekleničke prestavili v sterilno komoro. Počakali smo, da alkohol izhlapi preden smo odprli zamrzovalno stekleničko.
5. Z 1 ml pipeto smo prestavili vsebino zamrzovalne stekleničke v 50 ml epruveto.
6. Celicam smo ob mešanju po kapljicah dodajali 15 ml svežega gojišča za hEMC, segretega na 37°C.
7. Celice smo centrifugirali na 114g 5 minut. S pipeto smo previdno odstranili supernatant.
8. Kolonije smo resuspendirli v svežem gojišču za hEMC.
9. Kolonije smo nasadili v 1 vdolbino plošče s 6 vdolbinami oz. 1 ploščo s 4 vdolbinami (na površino enako tisti, na kateri so celice rastle pred zamrzovanjem).
10. Celice smo gojili v 2-3 ml gojišča na vdolbino plošče s 6 vdolbinami in v 0,5 ml gojišča na vdolbino plošče s 4 vdolbinami.
11. Plošče smo prestavili v inkubator in s stresanjem zagotovili homogeno razporeditev kolonij po površini vdolbine.
12. Rast celic smo spremljali z opazovanjem pod mikroskopom in vsak dan zamenjali gojišče hEMC s svežim.
13. Ko so celice prerasle dno vdolbine, smo odsesali gojišče in celice inkubirali v raztopini kolagenaze (1mg/ml KO-DMEM) pri 37°C 5 minut.
14. Ko so kolonije pričele odlepljati, smo dodali 1 ml gojišča hESC in jih postrgali iz površine. Kolonije smo zbrali v 50 ml epruveti, jih resuspendirali do manjše velikosti s 5 ml ali 10 ml pipeto in centrifugirali 114g 5 min.
15. Kolonije smo resuspendirali v svežem gojišču in jih nasadili na nove gojilne plošče (s hraničnimi plastmi) v razmerju 1:3.

3.4.3 Barvanje fenotipskih označevalcev hEMC

Princip ugotavljanja fenotipskih označevalcev je imunofluorescentno barvanje (**Slika 7**), to je s fluorescentno označenimi protitelesi.

Skozi ves postopek mora biti zagotovljena primerna vlažnost, da se celice ne izsušijo. Mi smo to zagotovili z obdajanjem posodic z mokrimi papirnatimi brisačami. Od dodatkov sekundarnih protiteles naprej je pomembno tudi, da prostor zatemnimo, da zaščitimo fluorescentne značke.

1. Po 3 dnevih gojenja smo kulturam odsesali gojišče.
2. Da bi preprečili razgradnjo proteinov, smo jih fiksirali. Za to smo uporabili fiksativ brez formalina. V fiksativu smo jih pustili 20 min.
3. Odstranili smo fiksativ in sprali celice s pufom 1x PBS.
4. Ker smo barvali tudi jedra in transkripcijski dejavnik Oct-4, ki se nahajajo znotraj celic, smo morali naluknjati celično membrano. To smo storili s 0,1% tritonom v 1x PBS. Po 10 minutah smo celice sprali z 1x PBS.
5. Celice smo 30 minut blokirali z 10% normalnim konjskim serumom v 1x PBS.
6. Pripravili smo raztopino primarnih protiteles z raztopino za zmanjšanje ozadja. Uporabili smo protitelesa proti SSEA-1 (redčena v razmerju 1:60, protitelo : raztopina za zmanjšanje ozadja), SSEA-4 (1:40), Tra-1-60 (1:60), Tra-1-81 (1:60) in Oct-4 (1:50). Vsa protitelesa so bila mišja, razen protitelesa proti Oct-4, ki so bila kozja.
7. Celice smo prekrili s protitelesom in inkubirali pri sobni temperaturi 1 uro.
8. Potem smo odstranili primarno protitelo in 3-krat sprali z 1x PBS.
9. Pripravili smo raztopine sekundarnih protiteles z raztopino za zmanjšanje ozadja. Uporabili smo protitelesa proti mišjim protitelesom in protitelesa proti kozjim protitelesom. Obojne smo redčili v razmerju 1:200 (protitelo : raztopina za zmanjšanje ozadja).
10. Celice smo prekrili s protitelesi in jih inkubirali na sobni temperaturi 30 minut.
11. Od uporabe sekundarnih protiteles (so označena s fluorescentno značko) naprej mora ves postopek potekati v zatemnjenem prostoru.
12. Po 30 minutah smo odstranili sekundarna protitelesa in 2- do 3-krat sprali z 1x PBS.
13. Pri zadnjem spiranju smo v 1x PBS dodali DAPI (v razmerju 1:500), kiobarva jedra. Celice smo inkubirali 1-2 minuti in ponovno sprali z 1x PBS.
14. Za pregled pod mikroskopom, smo celice pustili v 1x PBS.

3.4.4 Opazovanje pobarvanega ekstracelularnega matriksa pod fluorescentnim mikroskopom

Pobarvane komponente ekstracelularnega matriksa smo opazovali pod fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom Olympus IX81 pod 100-kratno povečavo.

3.4.5 Analize izražanja značilnih genov hEMC in postopki z RNA

Izolacija RNA:

Za izolacijo RNA iz ASC, ki so rasle v dveh različnih gojiščih (gojišču za MEF in gojišču za hEMC), smo uporabili komplet »RNeasy Mini Kit«.

Postopek izolacije:

1. Poželi smo celice, ki so rasle v monosloju. To smo storili s tripsinizacijo in zbiranjem usedline celic. Supernatant smo popolnoma odstranili.
2. Celice smo razbili s pufrom RTL (350 µL). Po dodatku pufra smo vzorce premešali na mešalu.
3. Homogeniziranemu lizatu smo dodali 350 µl 70% etanola in dobro zmešali s pipetiranjem.
4. 700 µl vzorca smo prenesli na kolono – vključno s precipitatom, če se je tvoril. Centrifugirali smo 15 s pri najvišjih obratih. Zavrgli smo nevezano frakcijo.
5. Na kolono smo dodali 700 µl pufra RW1. Centrifugirali smo 15 s pri najvišji hitrosti. Zavrgli smo nevezano frakcijo.
6. Na kolono smo dodali 500 µl pufra RPE. Centrifugirali smo 2 minuti s pri najvišji hitrosti. Zavrgli smo nevezano frakcijo.
7. Kolono smo prestavili v novo 1,5 ml tubico in dodali direktno na membrano kolone 20 ml »RNase-free« vode. Centrifugirali smo 1 minuto pri najvišji hitrosti, da smo eluirali RNA.

Pred začetkom izolacije smo ves material poškropili s sprejem proti RNAzam.

Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR):

Za reverzno transkripcijo izolirane RNA smo uporabili komplet »SuperScript III First-strand«.

Postopek:

1. Najprej smo pult, aparat za PCR, pipete in ves ostali material poškropili s sprejem proti RNazam.
2. Reagente smo odtajali in jih vorteksirali (razen encimov) ter jih dali nazaj na led.
3. Pripravili smo mešanico 1 (2 µl na vzorek):
 - naključni heksameri (50 ng/µl) 1 µl
 - mešanica 10 mM dNTP 1 µl

4. Vodo smo izpustili, ker je bila koncentracija RNA zelo nizka in nismo redčili (koncentracijo RNA smo izmerili s fluorometrom Qubit 1.23).
5. RNA smo odtajali, jo premešali na mešalu in na hitro pocentrifugirali. Iz vsakega vzorca RNA smo vzeli 8 µl in jih dodali 2 µl mešanice 1. Preden smo vzeli RNA iz epruvete, smo jo s pipeto malo premešali. Prav tako, ko smo jo dodali mešanici 1. Epruvete smo dobro zaprli.
6. Epruvete smo prenesli v aparat za PCR. 5 minut smo jih pustili na 65°C. Nato smo jih prenesli na led za najmanj 1 minuto.
7. Pripravili smo mešanico 2 (mešanica za sintezo cDNA) (10 µl na vzorček):
 - 10x RT pufer 2 µl
 - 25 nM MgCl₂ 4 µl
 - 0,1 M DTT 2 µl
 - RNase OUT (40 U/□µl) 1 µl (vzeli smo sproti iz hladilnika)
 - SuperScript III RT (200 U/□µl) 1□µl
8. Na koncu smo čisto rahlo premešali na mešalu in na hitro pocentrifugirali.
9. Vzorčkom, ki čakajo na ledu smo dodali 10 ml mešanice 2. Nežno smo premešani na mešalu in centrifugirali.
10. Tubice smo spet prenesli v aparat za PCR. 10 minut smo jih imeli na 20°C, sledilo je 50 minut na 50°C in 5 minut na 85°C. Nato smo jih ohladili na ledu.
11. V vsako epruveto smo dodali 1 µl RNase H in inkubirali 20 minut na 37°C.

Merjenje koncentracije RNA:

RNA smo izmerili s flourometrom Qubit 1.23 po protokolu navedenem v navodilih za uporabo in uporabili komplet za določanje koncentracije RNA.

3.4.6 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) v realnem času

Raztopino cDNA smo z vodo brez nukleaz redčili 10 x (do 200 µl) in 5 µl uporabili za pomnožitev specifičnih produktov s PCR v realnem času.

V plošče s 96 vdolbinicami smo za tarčni gen Nanog pripravili sledeče reakcijske mešanice (končni volumen reakcije 25 µl):

10 µl »TaqMan® Universal PCR Master Mix«

1,8 µl 10 pmol/□µl začetnega oligonukleotida 1 (končna konc. 900 nM)

1,8 µl 10 pmol/□µl začetnega oligonukleotida 2 (končna konc. 900 nM)

0,8 µl 5 pmol/µl sonde (končna konc. 200 nM)

0,6 µl vode brez nukleaz

5 µl vzorca redčene cDNA

Za tarčne gene Oct-4, Sox-2, Brachyury, Sox-17 ter za hišni gen GAPDH smo pripravili sledče reakcijske mešanice (končni volumen reakcije 25 µl):

10 µl »TaqMan®Universal PCR Master Mix«

1 µl »GAPDH TaqMan Universal Endogenous Control«

4 µl vode brez nukleaz

5 µl vzorca redčene cDNA

Ploščice smo zaprli s samolepljivo prosojno folijo in cDNA pomnoževali v aparatu ABI PRISM® 7900HT (Applied Biosystems, ZDA) po naslednjem programu:

začetna denaturacija vzorca (1 cikel):

50 °C 2 min

95 °C 10 min

pomnoževanje (50 ciklov):

95 °C 15 s denaturacija

60 °C 1 min prileganje začetnih oligonukleotidov, pomnoževanje

Rezultate smo analizirali s programom SDS 2.1 (Applied Biosystems, ZDA), pri čemer smo za nastavitev osnovnih vrednosti (angl. baseline) ter mejnih vrednosti fluorescence (angl. threshold) upoštevali napotke proizvajalca.

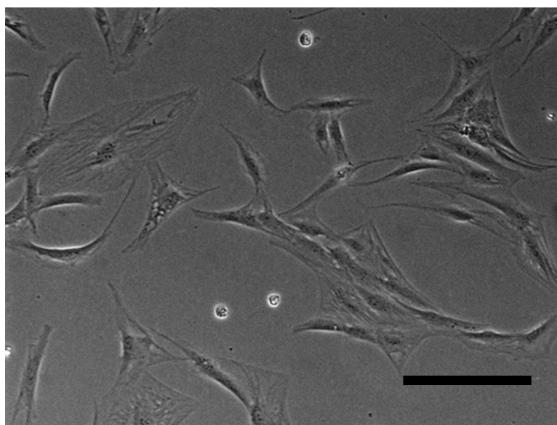
Izražanje tarčnih genov smo normalizirali na izražanje hišnega gena, in jih predstavili kot relativne vrednosti za vsak eksperiment ter tip celic (hEMC, ASC).

4 REZULTATI

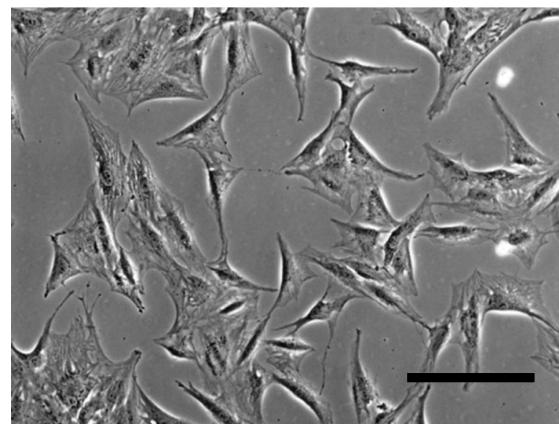
4.1 RAST IN MORFOLOGIJA ASC IN PRIMERJAVA Z MMC IZ KOSTNEGA MOZGA

Po odmrzovanju in nekaj dneh gojenja, se je večina celic ASC pritrnila na dno gojilne posode (**Slika 13**), podobno kot MMC. Opaziti je bilo še nekaj manjših okroglih nepritrjenih celic. Pritrjene celice so bile ploščate oblike in razvezjane (prav tako MMC) – fibroblastna oblika. Ob večji konfluentnosti so postale bolj podolgovate, bolj kot MMC.

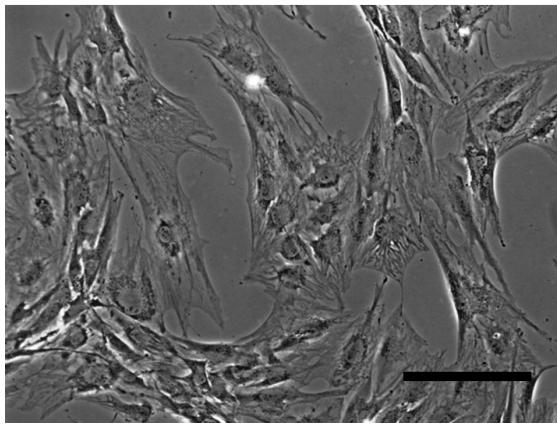
Slike 13-20 prikazujejo različne pasaže celic ASC in MMC ter različne konfluentnosti.



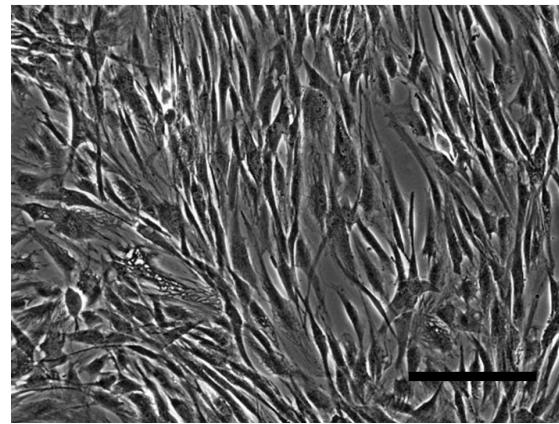
Slika 13: ASC, 1. pasaža, ~30% konfluentnost, fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 µm.



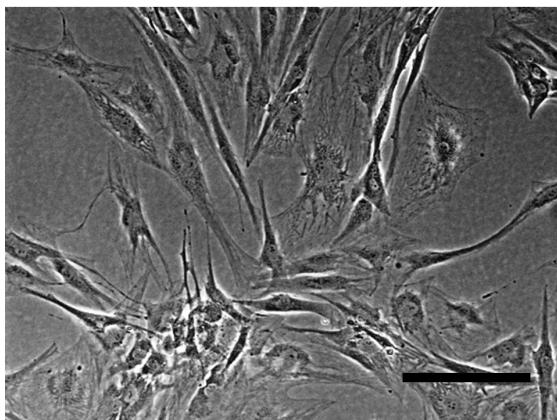
Slika 14: ASC, 1. pasaža, ~50% konfluentnost, fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 µm.



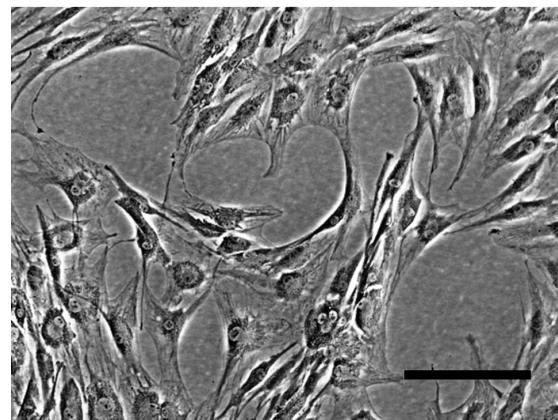
Slika 15: ASC, 1. pasaža, ~70% konfluentnost, fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 µm.



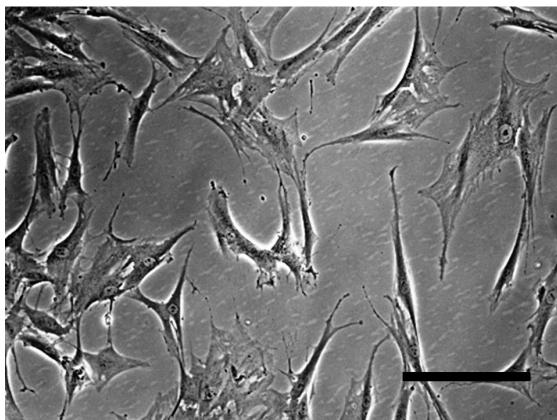
Slika 16: ASC, 2. pasaža, ~90% konfluentnost fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 µm.



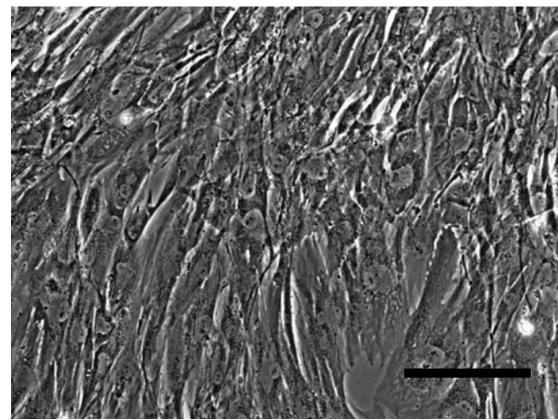
Slika 17: ASC, 3. pasaža, ~40% konfluentnost, fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 µm.



Slika 18: ASC, 3. pasaža, ~50% konfluentnost, fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 µm.



Slika 19: MMC, 2. pasaža, ~30% konfluentnost, fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 µm.



Slika 20: MMC, 5. pasaža, ~90% konfluentnost, fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 µm.

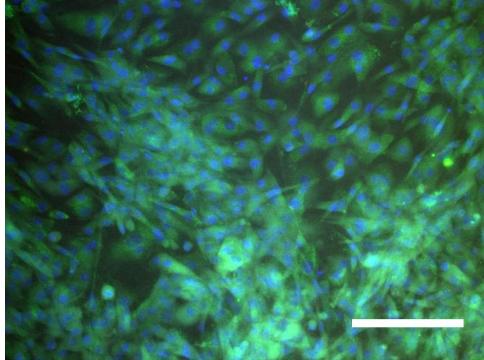
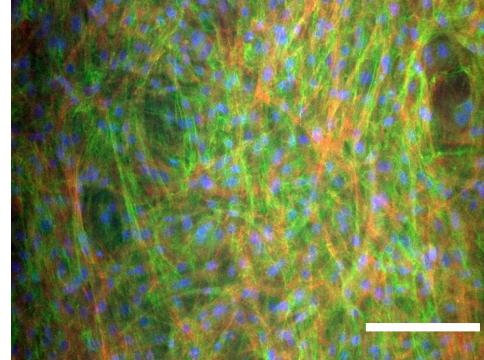
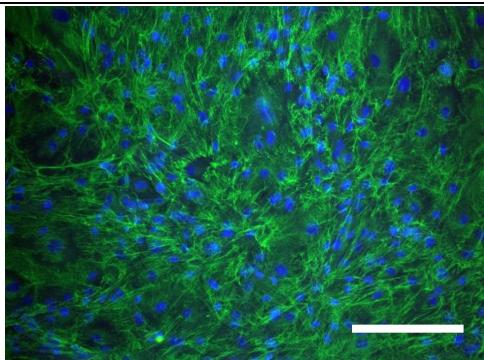
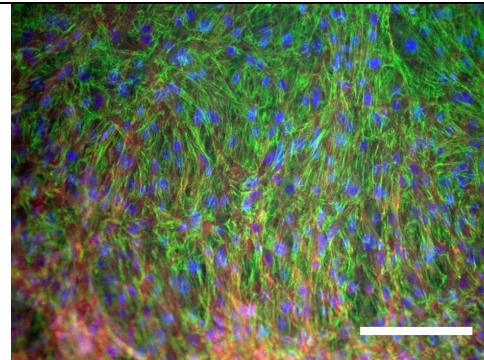
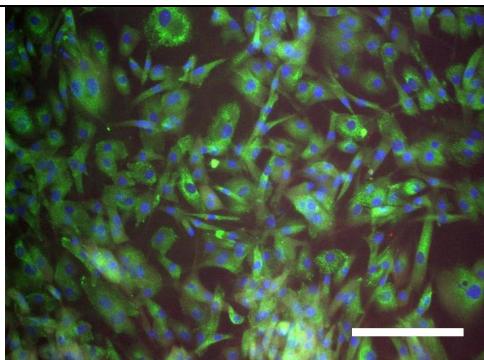
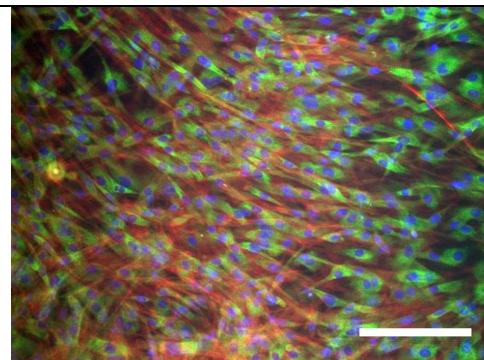
Hitrost delitve ASC se je med pasažami spreminja, v povprečju pa se je število celic v eni pasaži povečalo za 3-4x (torej smo iz nasajenih 500.000 celic pridobili približno 1,5-2 milijona celic) v 10 dneh (povprečno).

4.2 PRIMERJAVA EKSTRACELULARNEGA Matriksa PRI MMC IN ASC V MEF GOJIŠČU IN GOJIŠČU hEMC

Preglednica 14 predstavlja razlike v ekstracelularnem matriksu (ECM) med ASC in MMC. Zeleno so obarvane komponente ECM. Modro so jedra. Rdeče so obarvana stresna vlakna (aktinski filamenti).

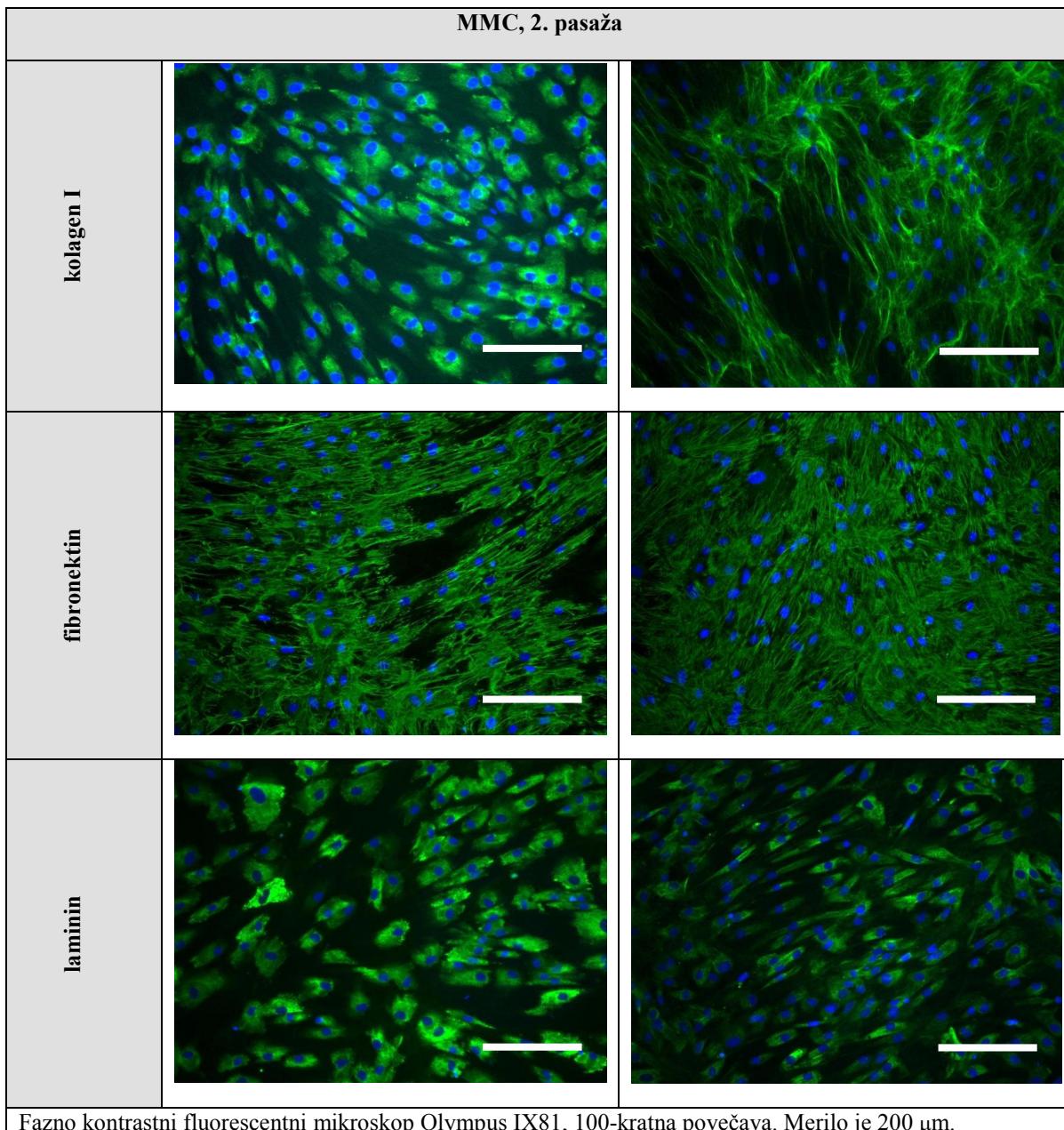
Opazili smo, da se oblika obojnih celic po menavi gojišča iz gojišča za MEF na gojišče za hEMC spremeni – postanejo ožje. Pri ASC se pojavijo tudi stresna vlakna. Komponente ECM so prisotne v obeh gojiščih. Opazili smo, da se kolagen I, tako pri ASC kot MMC sprosti iz celic ob spremembri iz gojišča MEF na gojišče hEMC.

Preglednica 14: Primerjava komponent ekstracelularnega matriksa (ECM) pri MMC in ASC v dveh različnih gojiščih

komponenta ECM	gojišče za MEF	gojišče za hEMC
ASC, 3. pasaža		
kolagen I		
fibronektin		
laminin		

Se nadaljuje.

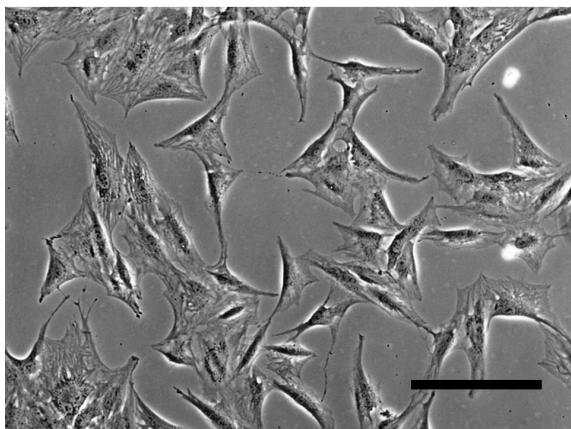
Nadaljevanje.



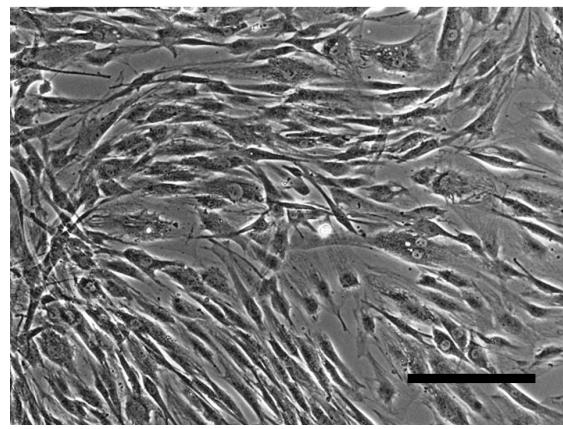
4.3 PRIMERJAVA RASTNIH KRIVULJ BMSC IN ASC V PETIH RAZLIČNIH GOJIŠČIH

Tako ASC kot MMC v različnih gojiščih različno rastejo. Razlike so v hitrosti rasti in morfologiji celic. Obema tipoma celic je skupen relativno počasen proliferacijski čas. *In vitro* se ASC podvojijo v 2 do 4 dneh, odvisno od gojišča in zaporedne pasaže (Gimble in sod., 2007). Podvojitveni čas MMC je 48 ur (Muraglia in sod., 2008).

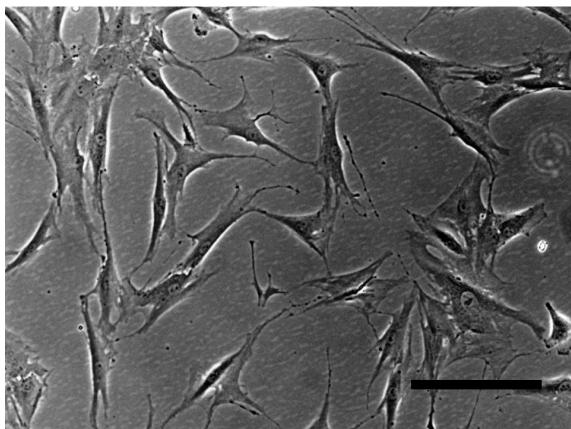
Slike 21-26 prikazujejo različno obnašanje celic ASC in MMC v MEF in hEMC gojišču.



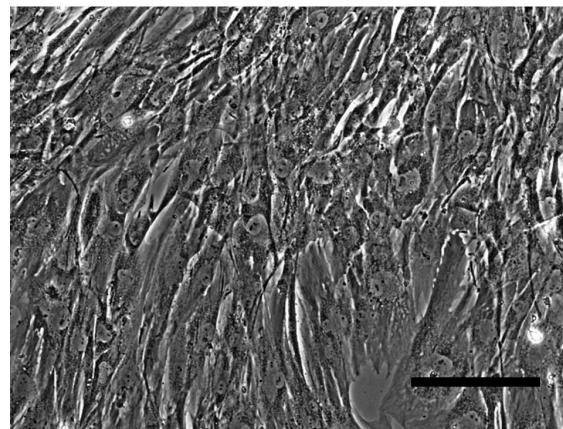
Slika 21: ASC, 1. pasaža, MEF gojišče, manj konfluentne, fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 μm .



Slika 22: ASC, 2. pasaža, MEF gojišče, bolj konfluentne, fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 μm .



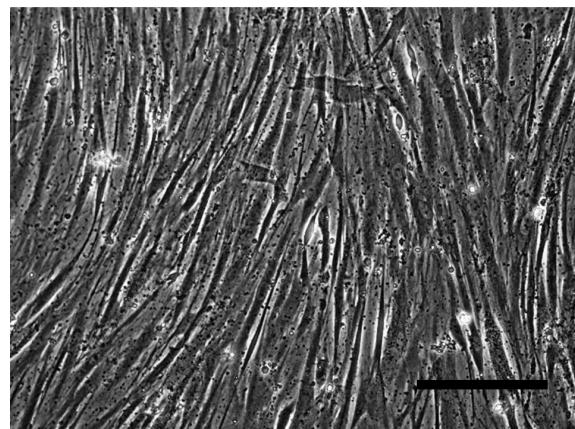
Slika 23: MMC, 2. pasaža, MEF gojišče, manj konfluentne, fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 μm .



Slika 24: MMC, 5. pasaža, MEF gojišče, bolj konfluentne, fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 μm .



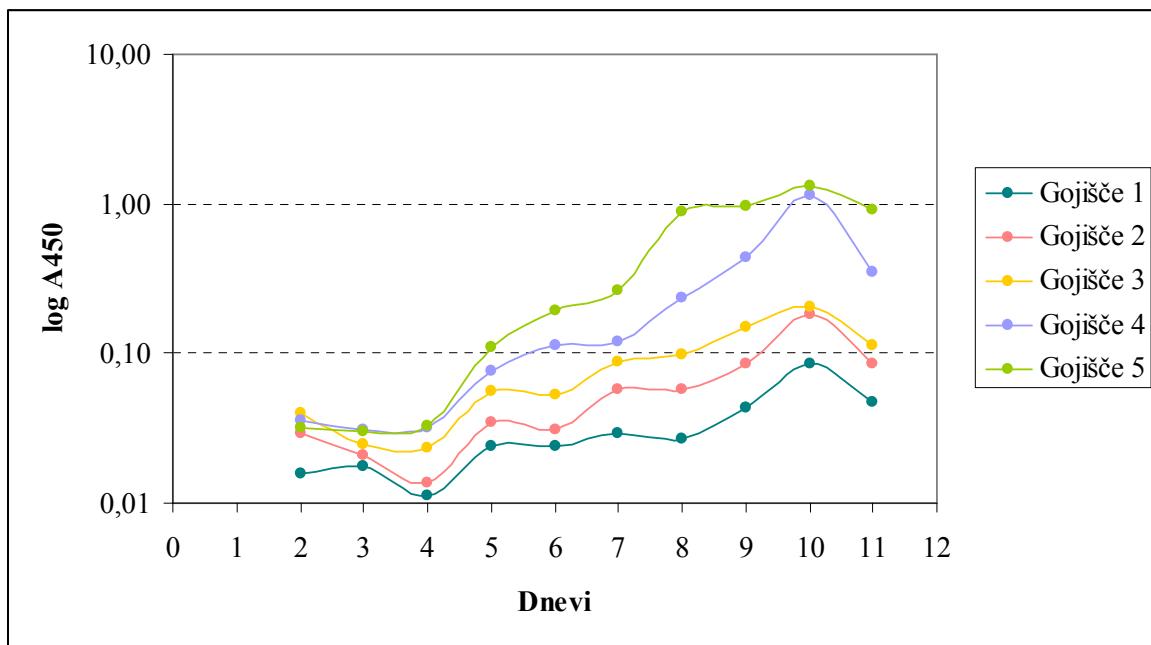
Slika 25: ASC, 5. pasaža, hEMC gojišče (nasajeno za hranilno plast), fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 μm .



Slika 26: MMC, 5. pasaža, hEMC gojišče (nasajeno za hranilno plast), fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 μm .

Opazili smo, da se morfologija celic ASC in MMC po menjavi gojišča za MEF na gojišče za hEMC spremeni – postanejo dolge in ozke. Spremeni se tudi hitost rasti. Zato smo želeli ugotoviti, katera je tista komponenta gojišča za hEMC, ki ima največji vpliv na to spremembo. S tem namenom smo pripravili pet različnih gojišč – gojišče 1 je MEF gojišče (90% DMEM z visoko vsebnostjo glukoze, 10% topotno inaktiviranega seruma), gojišče 5 je gojišče za hEMC (80% KO-DMEM z visoko vsebnostjo glukoze, 20% KO-serum, neesencialne aminokisline, L-glutamin, β -merkaptoetanol in bFGF), ostala gojišča so nianse med obema (gojišče 2 je enako kot MEF gojišče, le da je namesto HI-seruma KO-serum, gojišče 3 je enako kot gojišče 2, le da je KO-seruma 20% in ne 10%, gojišče 4 je enako kot hEMC gojišče, le da je namesto KO-DMEM z visoko vsebnostjo glukoze DMEM z visoko vsebnostjo glukoze).

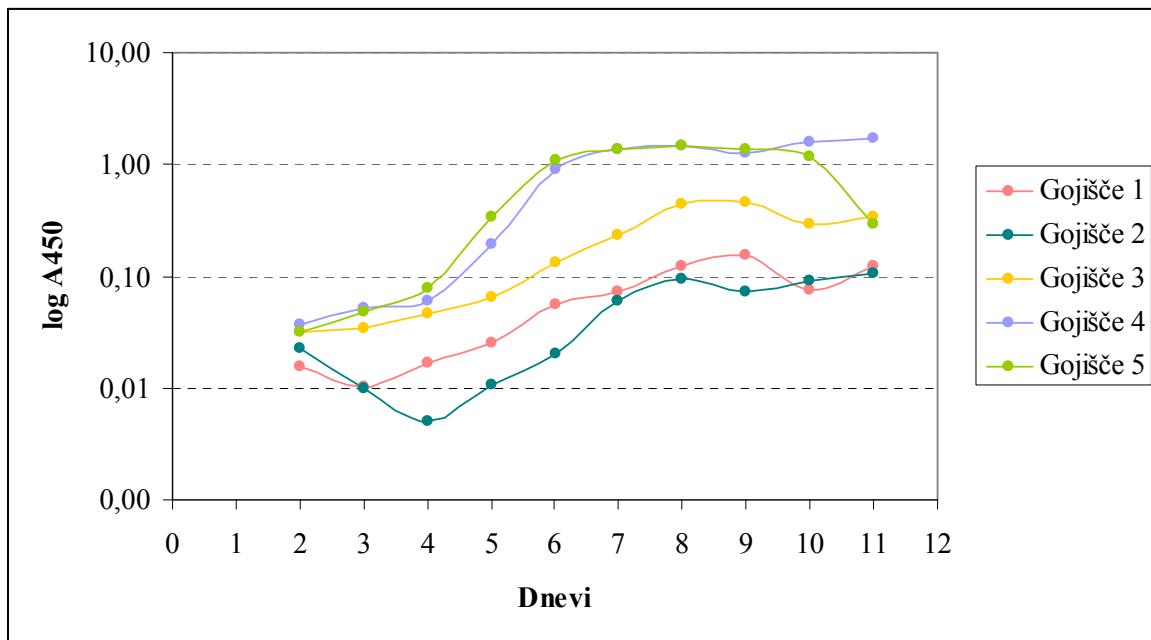
V MEF gojišču so se celice MMC (**Slika 27**) podvojile povprečno v 50 urah, enako v gojišču 2 (90% DMEM z visoko vsebnostjo glukoze, 10% KO-serum), v gojišču 3 (80% DMEM z visoko vsebnostjo glukoze, 20% KO-serum) povprečno v 48 urah, v gojišču 4 (80% DMEM z visoko vsebnostjo glukoze, 20% KO-serum, neesencialne aminokisline, L-glutamin, β -merkaptoetanol in bFGF) povprečno v 12 urah in v hEMC gojišču povprečno v 10 urah (podvojitveni čas smo ocenili iz točk, ki se najbolj približujejo teoretičnemu eksponentnemu delu rastne krivulje – gledali smo, kdaj se je absorbanca v eksponentnem delu rasti povečala za dvakrat).



Slika 27: Rast celic MMC, 3. pasaža, v petih različnih gojiščih (gojišče 1 = gojišče za MEF, Gojišče 5 = gojišče za hEMC)

V MEF gojišču so se celice ASC (**Slika 28**) podvojile povprečno v 50 urah, enako v gojišču 2 (90% DMEM z visoko vsebnostjo glukoze, 10% KO-serum), v gojišču 3 (80% DMEM z visoko vsebnostjo glukoze, 20% KO-serum) povprečno v 40 urah, v gojišču 4 (80% DMEM z visoko vsebnostjo glukoze, 20% KO-serum, neesencialne aminokisline, L-glutamin, β -merkaptoetanol in bFGF) in v hEMC gojišču pa povprečno v 12 urah

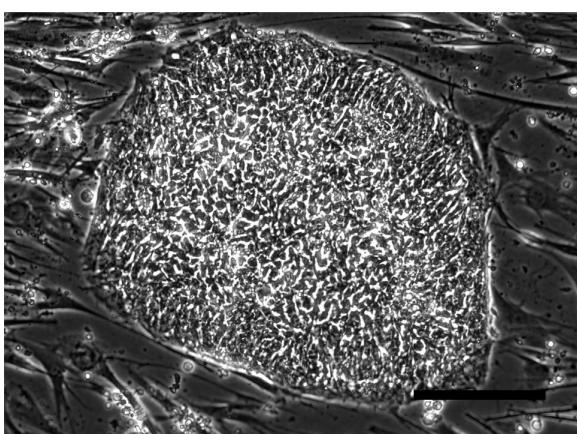
(podvojvitveni čas smo ocenili iz točk, ki se najbolj približujejo teoretičnemu eksponentnemu delu rastne krivulje – gledali smo, kdaj se je absorbanca v eksponentnem delu rasti povečala za dvakrat).



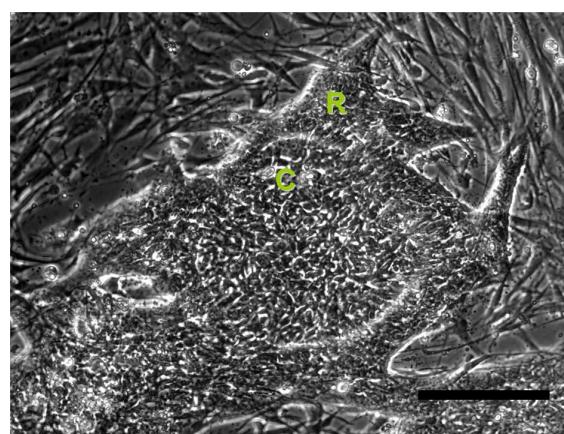
Slika 28: Rast celic ASC, 3. pasaža, v petih različnih gojiščih (gojišče 1 = gojišče za MEF, Gojišče 5 = gojišče za hEMC)

4.4 PRIMERJAVA RASTI EMBRIONALNIH MATIČNIH CELIC NA MEF IN NA ASC

Na ASC hranilnih plasteh smo opazili specifično morfologijo rasti hESC, ki se razlikuje od rasti na MEF. Lahko ločimo centralni okrogli notranji del ter robni »razvejen« del kolonije hEMC, medtem ko imajo kolonije hEMC na MED hranilnih plasteh jasen rob (Sliki 29 in 30).

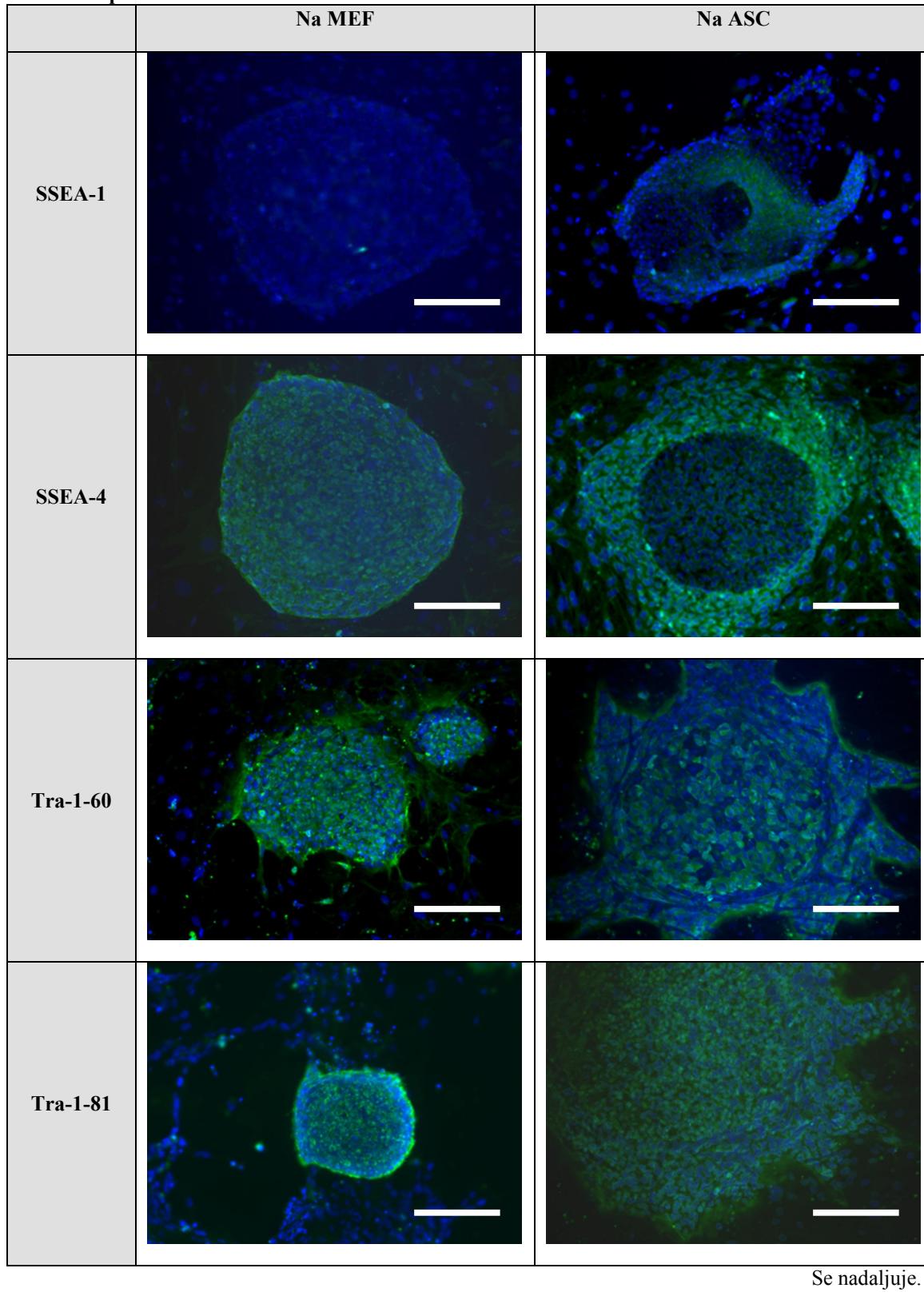


Slika 29: hEMC a MEF hranilnih plasteh, fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 µm.

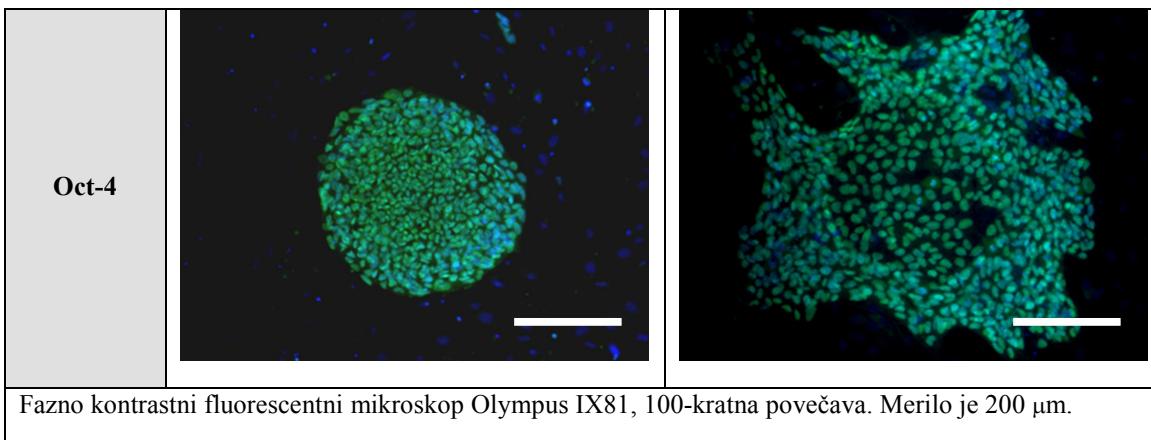


Slika 30: hEMC na ASC hranilnih plasteh, vidna sta centralni (C) in robni (R) del, fazno kontrastni fluorescentni mikroskop Olympus IX81, 100-kratna povečava. Merilo je 200 µm.

Preglednica 15: Izražanje embrionalnih označevalcev na kolonijah hEMC gojenih na MEF in ASC hrnilnih plasteh



Nadaljevanje.



Tako hEMC gojene na MEF, kot hEMC gojene na ASC so izražale embrionalne ozačevalce SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81 in Oct-4. Vzorci so zaradi same morfologije kolonij malce različni. So pa nekatere hEMC na ASC izražale tudi SSEA-1, ki je označevalec diferenciacije in ga nediferencirane hEMC ne izražajo (**Preglednica 15**).

4.5 IZRAŽANJE GENOV V hEMC V DVEH RAZLIČNIH SISTEMIH

Zanimalo nas je, kako so izraženi geni pluripotentnosti v enem ali drugem sistemu (gojenje hEMC na MEF in na ASC). To smo preučevali z reakcijo PCR v realnem času. Najprej smo izrezali vzorce hEMC iz hranilnih plasti (pri hEMC na ASC smo vzeli vzorec iz sredine in iz roba kolonije, ker sta bili področji morfološko različni). Nato smo iz vzorcev izolirali RNA, jo reverzno prepisali v cDNA, ter pomnožili gene, ki so nas zanimali z reakcijo PCR v realnem času.

Spodnji rezultati (**Preglednice 16-21, Slike 31-36**) prikazujejo izražanje genov Oct-4, Sox-2, Nanog, Brachyury, Sox-17 in Pax-6. »Eksp#« pomeni eksperiment pod zaporedno številko, »Povpr« pomeni povprečje in »Stdev« pomeni standardno deviacijo.

Oznaka »hEMC center« pomeni vzorec hEMC iz sredine kolonije, ki je rasla na ASC. Oznaka »hEMC rob« pomeni vzorec hEMC iz roba kolonije, ki je rasla na ASC. Oznaka »hEMC mef« pomeni vzorec hEMC iz kolonije, ki je rasla na MEF. Med posameznimi eksperimenti smo opazili razmeroma visoko variabilnost, zato smo vzorčenje izvedli v 8 neodvisnih eksperimentih. Iz izračuna povprečij smo izvzeli eksperimente, kjer so bile vzorčene kolonije druge pasaže na hranilnih plasteh ASC, ter vrednosti, ki so močno odstopale od povprečja (podatki niso prikazani).

Preglednica 16: Izražanje gena Oct-4

	Eksp1	Eksp3	Eksp4	Eksp5	Eksp7	Eksp8	Povpr	Stdev
hEMC center	4,240	2,744	1,250	1,943	1,133	3,022	2,389	1,185
hEMC rob	3,204	3,528	2,994	1,836	0,906	1,955	2,404	1,002
hEMC mef	1,835	2,439	2,426	1,193	1,125	0,799	1,636	0,702

Preglednica 17: Izražanje gena Sox-2

	Eksp1	Eksp3	Eksp4	Eksp5	Eksp7	Eksp8	Povpr	Stdev
hEMC center	1,249	1,037	1,987	0,396	0,532	0,936	1,252	0,800
hEMC rob	1,176	1,037	1,563	0,945	0,650	0,880	1,099	0,321
hEMC mef	2,357	0,960	1,671	1,320	1,295	1,400	1,557	0,461

Preglednica 18: Izražanje gena Nanog

	Eksp1	Eksp3	Eksp4	Eksp5	Eksp7	Eksp8	Povpr	Stdev
hEMC center	43,619	54,151	40,487	96,565	103,669	66,730	70,841	26,110
hEMC rob	76,339	81,240	76,140	56,342	102,169	96,767	85,780	18,790
hEMC mef	52,405	56,957	45,632	31,326	36,772	15,362	40,189	13,987

Preglednica 19: Izražanje gena Brachyury

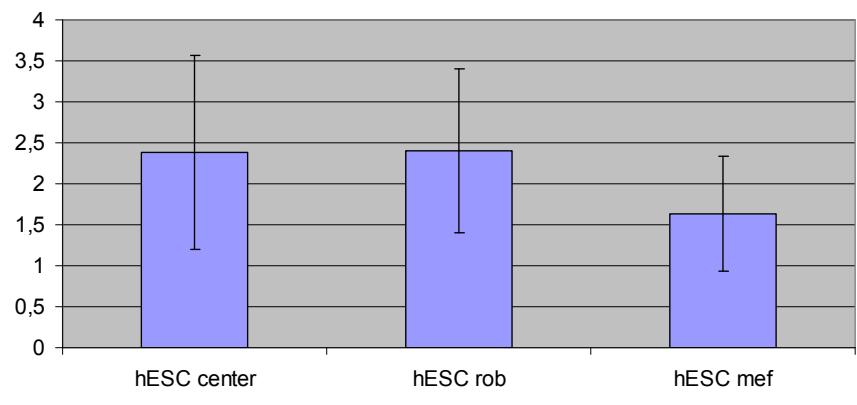
	Eksp1	Eksp3	Eksp4	Eksp5	Eksp7	Eksp8	Povpr	Stdev
hEMC center	0,604	0,088	0,114	0,430	0,178	0,168	0,245	0,195
hEMC rob	1,650	0,297	0,469	0,066	0,521	0,601	0,635	0,509
hEMC mef	0,141	0,533	0,079	0,066	0,185	0,061	0,156	0,174

Preglednica 20: Izražanje gena Sox-17

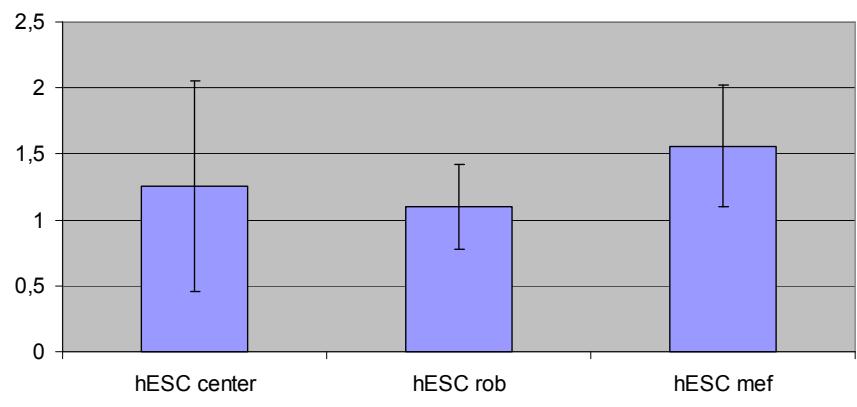
	Eksp1	Eksp3	Eksp4	Eksp5	Eksp7	Eksp8	Povpr	Stdev
hEMC center	0,748	0,217	0,150	0,118	0,098	0,486	0,303	0,260
hEMC rob	0,552	0,335	0,718	0,063	0,120	0,825	0,435	0,314
hEMC mef	0,537	0,307	0,342	0,128	0,168	0,184	0,278	0,152

Preglednica 21: Izražanje gena Pax-6

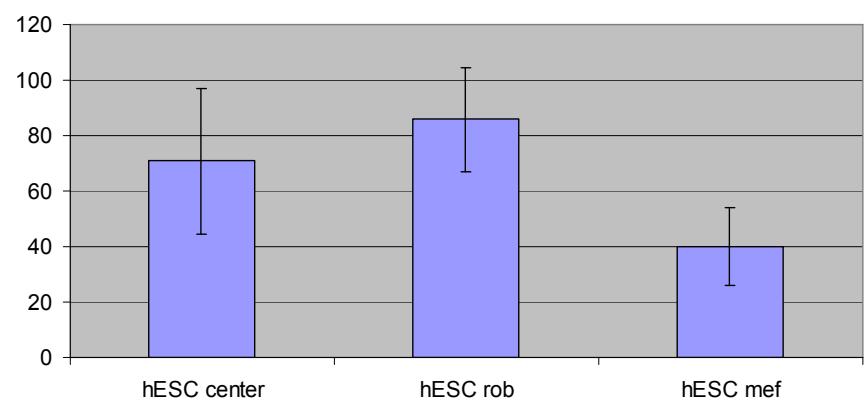
	Eksp1	Eksp3	Eksp4	Eksp5	Eksp7	Eksp8	Povpr	Stdev
hEMC center	0,038	0,147	0,077	0,112	0,029	0,639	0,149	0,222
hEMC rob	0,000	0,283	0,098	0,101	0,057	0,148	0,098	0,098
hEMC mef	0,243	0,080	0,031	0,140	0,061	1,098	0,238	0,387



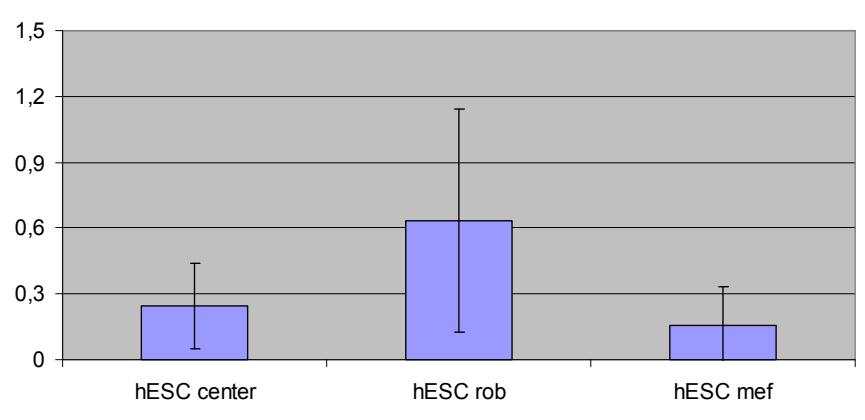
Slika 31: Relativno izražanje gena Oct-4 glede na hišni gen GAPDH



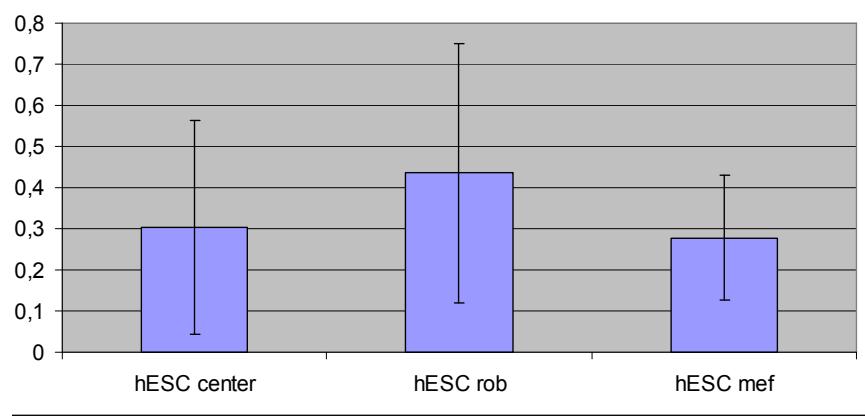
Slika 32: Relativno izražanje gena Sox-2 glede na hišni gen GAPDH



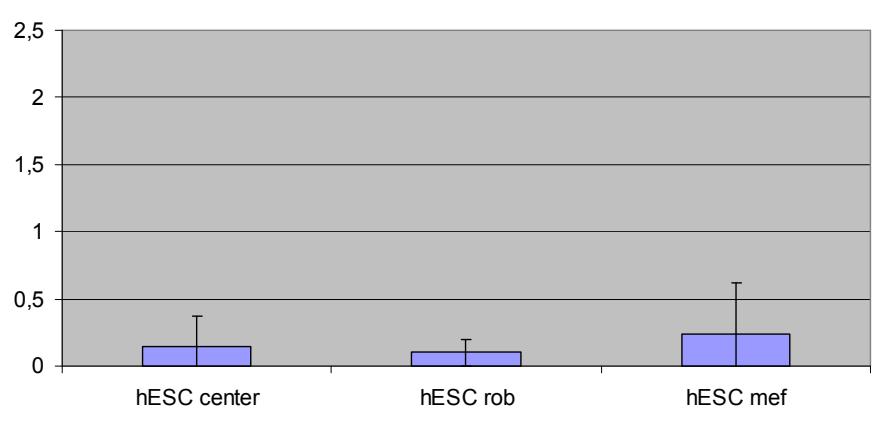
Slika 33: Relativno izražanje gena Nanog glede na hišni gen GAPDH



Slika 34: Relativno izražanje gena Brachyury glede na hišni gen GAPDH



Slika 35: Relativno izražanje gena Sox-17 glede na hišni gen GAPDH



Slika 36: Relativno izražanje gena Pax-6 glede na hišni gen GAPDH

Hišni gen (angl. housekeeping gene) je konstitutivni gen, ki se prepisuje relativno konstantno v mnogih ali vseh znanih pogojih. Njegovi produkti so pomembni za vzdrževanje celice. Predvideva se, da eksperimentalni pogoji ne vplivajo na njegovo izražanje. Primeri hišnih genov so aktin, GAPDH in ubikvitin. Zato smo mi rezultate izražanja genov hEMC normalizirali glede na izražanje gena GAPDH.

Videti je, da so Oct-4, Sox-2 in Nanog v hEMC iz ASC hraničnih plasti močno izraženi, kar se ujema z barvanjem (Oct-4 je pozitiven). Nanog je celo nekoliko povečan glede na hEMC gojene na MEF hraničnih plasteh.

Po drugi strani je v kolonijah na ASC nekoliko povečano izražanje tudi genov Brachyury in Sox-17. Povečano izražanje gena Brachyury nakazuje, da se morda celice nekoliko diferencirajo proti mezodermu. Povečano izražanje Sox-17 pa kaže na diferenciacijo v smeri endoderma.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Hranilne plasti so s svojimi lastnostmi in interakcijami z EMC pomembne za vzdrževanje nediferenciranega stanja EMC. So osnova za gojenje EMC in so zelo pomembne v različnih raziskavah (raziskovanje embrionalnega razvoja, diferenciacije v tkiva različnih zarodnih plasti, potencialna uporaba diferenciranih celic v regenerativni medicini...). MEF so se dolgo uporabljali za hranilne plasti, ker pa so živalskega izvora, se jih skuša nadomeščati s človeškimi celičnimi linijami. Znanstveniki vzpostavljajo tudi kulture EMC, ki bi se jih lahko gojilo brez hranilnih plasti. Za več človeških celičnih tipov je že bilo pokazano, da podpirajo nediferencirano rast EMC (**Preglednica 4**).

V študijah, ki zmanjšujejo uporabo živalskih komponent, so EMC ohranile podobne značilnosti kot EMC na MEF. Prav tako so izražale površinske označevalce SSEA-4, Tra-1-60 in Tra-1-81 (in niso izražale SSEA-1), transkripcijske dejavnike Oct-4, Sox-2 in Nanog, encima alkalno fosfatazo in telomerazo ter ohranile diferenciacijski potencial, ko so jih gojili v embrioidnih telescih ali jih presadili, da so tvorile teratome v ksenotransplantantih.

Manj raziskav je bilo usmerjenih v preučevanje specifičnih značilnosti različnih hranilnih celic in mikrookolij, ki jih te proizvajajo (npr. citokinov, ki jih izločajo) v sokulti z EMC.

Študije so pokazale tudi, da topologija substrata igra veliko vlogo pri gojenju EMC in njihovi morfologiji (porazdelitev in raztezanje) in da citoskelet igra aktivno vlogo v odzivu na kontaktno usmerjanje EMC (Gerecht in sod., 2007a). Nadaljnje študije so potrebne za pojasnitev, kako različni pogoji gojenja vplivajo na fenotip in specifične diferenciacijske potenciale različnih linij EMC.

Zaradi potencialne dostopnosti velike količine odvečne maščobe, ki se po operacijskih posegih zavrže, podobnosti ASC z MMC iz KM ter multipotentnega značaja, so ASC primeren vir za najrazličnejše uporabe. Mi smo jih poskusili uporabiti za hranilno plast. Zaenkrat ne obstaja še nobeno poročilo o uporabi ASC za hranilne plasti.

Naši začetni rezultati so obetavni, saj je pri hEMC gojenih na ASC nediferenciran fenotip močno izražen. Izraženi so vsi označevalci nediferenciranega stanja, ki smo jih preizkušali (SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81 in Oct-4) (**Preglednica 15**).

V primerjavi z hEMC gojenimi na MEF je morfologija kolonij drugačna. Ločita se okrogli centralni del in robni del, česar pri hEMC na MEF ni opaziti (kolonije imajo jasen rob) (**Slike 29 in 30**). Zaradi tega je tudi razporeditev označevalcev nediferenciranega stanja drugačna (**Preglednica 15**).

So pa nekatere kolonije hEMC gojene na ASC izražale tudi SSEA-1, ki je označevalec diferenciacije in ga nediferencirane hEMC ne izražajo (**Preglednica 15**).

Rezultati PCR v realnem času so pokazali, da hEMC na ASC izražajo gene pluripotentnosti, tako kot hEMC na MEF. Ti geni so Oct-4, Sox-2 in Nanog (**Slike 31-33**). Izražanje Nanoga je celo nekoliko povečano v primerjavi s hEMC, gojenimi na MEF. Rezultati se torej ujemajo z barvanjem, kjer je Oct-4 pozitiven. Jakost izražanja pa se razlikuje med okroglim, centralnim in robnim delom. Po drugi strani je v kolonijah hEMC

na ASC tudi nekoliko povečano izražanje genov Brachyury in Sox-17, ki sta pri hEMC na MEF negativna (**Sliki 34 in 35**). Povečano izražanje gena Brachyury nakazuje, da se morda celice nekoliko diferencirajo proti mezodermu. Povečano izražanje gena Sox-17 pa nakazuje usmeritev proti endodermu. Izražanje gena Pax-6, ki je indikator diferenciacije proti ektodermu, pa je v obeh sistemih negativno (**Slika 36**). Potrebne so nadaljnje študije, v katerih bi se razjasnilo možno izražanje označevalcev diferenciacije na proteinski ravni.

Da bi ugotovili, ali so ASC primerne hranilne plasti za gojenje hEMC, je potrebno poskuse ponoviti z ASC različnih ljudi, preizkusiti dolgotrajno gojenje na ASC (zaporedne pasaže), ter preučiti stabilnost nediferenciranega fenotipa, testirati kariotip, diferenciacijski potencial (v ET in imunsko oslabljenih miših) – kot priporoča mednarodna skupina za karakterizacijo MC (The International Stem Cell Initiative) (Characterization..., 2007).

Če bi se izkazalo, da se celice diferencirajo, bi se ASC lahko uporabilo kot sokulturo za indukcijo diferenciacije hEMC – kot se uporablja sokulture hEMC z mišjimi stromalnimi linijami OP-9 za hematoendotelialno diferenciacijo (Vodyanik in Slukvin, 2007).

Rast hEMC na ASC smo primerjali z rastjo na MEF, ker so MEF kot hranilna plast dobro okarakterizirani. Hkrati smo karakteristike ASC primerjali tudi z MMC iz KM, ker so si celice iz obeh tkiv med seboj zelo podobne in ker je bilo pokazano, da MMC iz KM podpirajo rast hEMC (Cheng in sod., 2003).

Po odmrzovanju in nekaj dneh gojenja, se je večina celic ASC pritrdila na dno gojilne posode (**Slika 13**), podobno kot MMC. Opaziti je bilo še nekaj manjših okroglih nepritrjenih celic. Pritrjene celice so bile ploščate oblike in razvejane (prav tako MMC) – fibroblastna oblika. Ob večji konfluentnosti so postale bolj podolgovate, bolj kot MMC (**Slike 13-20**). Ocenujemo, da so zaradi številčnosti (litri aspiratov) (Gimble in sod., 2007) in možnosti pomnožitve števila *in vitro* (3-4x/pasažo) v zgodnih pasažah (1-5) primeren vir za pripravo hranilnih plasti.

Opazili smo, da se oblika tako ASC kot MMC po menjavi gojišča iz gojišča za MEF na gojišče za hEMC spremeni – postanejo ožje (**Slike 21-26**). Pri ASC se pojavijo tudi stresna vlakna. ASC sintetizirajo komponente ECM, potrebne kot substrat za pritrditev hEMC (Godier in sod., 2008); kolagen I, laminin, fibronektin - tako v gojišču za MEF ter v gojišču za ESC. Pri tem razporeditev laminina in fibronektina ostane nespremenjena ob menjavi gojišča, kolagena I pa se ob menjavi tako pri ASC kot pri MMC sprosti iz celic (**Preglednica 14**).

Tako ASC kot MMC v različnih gojiščih različno rastejo; testirali smo gojišče MEF, gojišče hEMC ter različice gojišča MEF z dodatki gojišča hEMC (**Sliki 27 in 28**) in opazili razlike v hitrosti rasti in morfologiji celic. Obema tipoma celic je skupen relativno počasen proliferacijski čas v gojiščih 1 in 2. Celice MMC so se v gojišču MEF in v gojišču 2 podvojile povprečno v 50 urah, v gojišču 3 povprečno v 48 urah, v gojišču 4 povprečno v 12 urah in v hEMC gojišču povprečno v 10 urah. Celice ASC so se v MEF gojišču podvojile povprečno v 50 urah, enako v gojišču 2, v gojišču 3 povprečno v 40 urah, v gojišču 4 in v hEMC gojišču pa povprečno v 12 urah (gledali smo, kdaj se je absorbanca v eksponentnem delu rasti povečala za dvakrat). Podvojevalni čas v MEF gojišču se za oba tipa celic ujema s predhodnimi študijami (Gimble in sod., 2007; Muraglia in sod., 2008). Ker se gojišče hEMC razlikuje od gojišča MEF, se tudi podvojevalni čas obeh tipov celic

spremeni. Želeli smo izvedeti, katera je tista komponenta v gojišču hEMC, ki vpliva na to spremembo. Glede na to, da sama zamenjava topotno inaktiviranega seruma za KO-serum v gojišču 2 ne izzove večje spremembe (pri MMC ali ASC), smo sklepali, da ni ključna sama različica seruma ampak njegova koncentracija. V gojišču 3, ki vsebuje 20% KO-serum (2x višja koncentracija kot v gojišču 2) se je podvojevalni čas ASC močno skrajšal glede na gojišče 2, iz česar smo zaključili, da koncentracija KO-seruma močno vpliva na hitrost rasti celic.

V gojišču 4 se zgodi še večja sprememba. Gojišče 4 je enako gojišču hEMC, razlika je le v DMEM (v gojišču 4 je DMEM z visoko vsebnostjo glukoze, v hEMC gojišču pa KO-DMEM z visoko vsebnostjo glukoze). Celice so se podobno obnašale v gojišču 4 in v gojišču hEMC (gojišče 5). Torej je sprememba posledica dodatkov, ki so v gojišču hEMC (**Preglednica 11**). Sklepamo, da je za to odgovoren bFGF, zato priporočamo nadaljnje raziskave v tej smeri.

bFGF pospeši pomnoževanje MMC (krajši podvojevalni čas, večje število delitev) (Reese in sod., 2007). MMC, stimulirane z bFGF, ohranijo enak fenotip in imunomodulatorni potencial kot MMC gojene v običajnem gojišču (Reese in sod., 2007). Tako za MMC kot ASC so bile narejene študije, ki so pokazale, da bFGF vpliva na (in ohranja) njihov diferenciacijski potencial (Tsutsumi in sod., 2001; Suga in sod., 2007).

Opazili smo, da se je spremenila tudi morfologija celic ASC in MMC po menjavi gojišča MEF na gojišče hEMC. Celice so postale dolge in ozke (**Slike 21-26**). Pri ASC so se pojavila stresna vlakna. Pri obojih se je zgodila sprememba v kolagenu I, ki se je sprostil iz celic (**Preglednica 14**).

5.1 PRIHODNJE DELO

Predlagamo nadaljnje študije uporabe ASC za hranilne plasti, ki bodo vključevale več pasaž, preverjanje stabilnosti nediferenciranega fenotipa, kariotipa, diferenciacijskega potenciala za natančno karakterizacijo tako gojenih celic. Predlagamo tudi preverjanje rezultatov izražanja genov pluripotentnosti in diferenciacije na proteinski ravni.

V prihodnosti bi bilo zanimivo raziskati tudi povezavo med bFGF in sproščanjem kolagena I v ekstracelularni matriks, ter druge morfološke spremembe (pojavljanje stresnih vlaken) v kulturah ASC, ki se zgodijo na hranilnih celicah (ASC in MMC) ob menjavi gojišča iz MEF na hEMC in bi lahko vplivale na morfologijo in fenotip hESC. V literaturi lahko zasledimo, da bFGF inhibira izražanje gena za kolagen tipa I in s tem sintezo kolagena ter stimulira izražanje gena za kolagenazo, torej razgradnjo kolagena (Kennedy in sod., 1995), nismo pa našli poročil o vplivu na procesiranje in izločanje kolagena v ekstracelularni prostor.

6 POVZETEK

Pri postopkih gojenja nediferenciranih embrionalnih matičnih celic (EMC) in indukciji njihove diferenciacije *in vitro* je pomembno, poleg ustrezne sestave gojišč, zagotavljati tudi primeren substrat za pritrjanje kolonij EMC (hranilna plast ali matriks sestavljen iz ekstracelularnih proteinov, kot so laminin, fibronektin in vitronektin).

Hranilna plast je plast celic, običajno mišijih embrionalnih fibroblastov (MEF), ki se jo nasadi v gojilne posode, nanje pa se nato nasadi EMC. Celice hranilne plasti izločajo takšne ekstracelularne proteine, ki omogočajo pritrjanje EMC ter regulatorne molekule, ki so pomembne za vzdrževanje nediferenciranega stanja EMC. Raziskave gojenja EMC so usmerjene v iskanje primernih hranilnih plasti humanega izvora. Več celičnih tipov se je že izkazalo za uspešne. V teh študijah so EMC ohranile podobne značilnosti kot EMC gojene na MEF. Prav tako so izražale površinske označevalce SSEA-4, Tra-1-60 in Tra-1-81 (in niso izražale SSEA-1), transkripcijske dejavnike Oct-4, Sox-2 in Nanog, encima alkalno fosfatazo in telomerazo ter ohranile diferenciacijski potencial, ko so jih gojili v embrioidnih telescih ali jih presadili, da so tvorile teratome v ksenotransplantatih.

Potrebne so še raziskave specifičnih značilnosti različnih hranilnih celic in mikrookolij, ki jih te proizvajajo (na primer profil citokinov, ki jih izločajo) v sokulti z EMC.

Mi smo raziskovali možnost uporabe matičnih celic iz maščobe (ASC) za hranilne plasti. Človeško podkožno maščobno tkivo je potencialno dostopen vir velikega števila odraslih matičnih celic. Te so podobne mezenhimskim matičnim celicam (MMC) iz kostnega mozga (KM), ki so že bile uporabljene za hranilne plasti in smo jih lahko primerjali z njimi. Ker se povečuje število ljudi s prekomerno telesno težo, je podkožno maščobno tkivo izdaten in razmeroma dostopen vir MC. Lipoaspirati predstavljajo odpadno tkivo v liposukcijskih posegih, in se lahko uporabijo za izolacijo multipotentnih MC.

Naši rezultati so obetavni, saj je pri hEMC gojenih na ASC nediferenciran fenotip močno izražen. Izraženi so vsi označevalci nediferenciranega stanja, ki smo jih preizkušali (SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81) ter transkripcijski dejavniki Oct-4, Sox-2 in Nanog (slednji je celo malo povečan). Nekoliko izražen pa je tudi SSEA-1, ki je označevalc differenciacije in ga nediferencirane hEMC ne izražajo, ter gena Brachyury in Sox17, ki prav tako nakazujeta differenciacijo. Izražanje genov bo potreben preizkusiti še na proteinski ravni.

Opazili smo spremembe v hitrosti rasti in morfologiji ASC ter MMC v različnih gojiščih. V gojišču za hEMC celice postanejo ožje, pri ASC se pojavijo tudi stresna vlakna. Komponente ECM (laminin, fibronektin) so prisotne v gojiščih za hEMC in MEF, kolagena I pa se ob menjavi v gojišče za hEMC sprosti iz celic. Ob menjavi gojišča se poveča tudi podvojevalni čas. Predvidevamo, da je ključna komponenta za spremembo bFGF in priporočamo nadaljne raziskave v tej smeri.

7 VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

Alonso L., Fuchs E. 2003. Stem cells of the skin epithelium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 1: 11830-11835

Amit M., Margulets V., Segev H., Shariki K., Laevsky I., Coleman R., Itsikovitz-Eldor J. 2003. Human feeder layers for human embryonic stem cells. Biology of Reproduction, 68: 2150-2156

Amit M., Shariki C., Margulets V., Itsikovitz-Eldor J. 2004. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. Biology of Reproduction, 70: 837-845

Andrews P., Matin M., Bahrami A., Damjanov I., Gokhale P., Draper J. 2005. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. Biochememical Society Transactions, 33: 1526-30

Aoi T., Yae K., Nakagawa M., Ichisaka T., Okita K., Takahashi K., Chiba T., Yamanaka S. 2008. Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. Science, 1, 321 (5889): 699-702

Asakura A., Rudnicki M.A., Komaki M. 2001. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. Differentiation, 68, 4-5: 245-253

Blastocyst embryo grading pictures and photos from IVF, *in vitro* fertilization. Advanced fertility center of Chicago.

<http://www.advancedfertility.com/blastocystimages.htm> (31. 3. 2009)

Bochkov N.P., Voronina E.S., Kosyakova N.V., Liehr T., Rzhaninova A.A., Katosova L.D., Platonova V.I., Gol'dshtein D.V. 2007 Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 143, 1: 122-126

Böcker W., Moll R., Poremba C., Holland R., van Diest P.J., Dervan P., Bürger H., Wai D., Diallo R.I., Brandt B., Herbst H., Schmidt A., Lerch M.M., Buchwallow I.B. 2002. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. Laboratory Investigation, 82: 737-746

Bongso A., Richards M. 2004. History and perspective of stem cell research. Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, 18, 6: 827-842

Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnstone S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., Gifford D.K., Melton D.A., Jaenisch R., Young R.A. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell, 122: 947-956

- Braam S.R., Zeinstra L., Litjens S., Ward-van Oostwaard D., van den Brink S., van Laake L., Lebrin F., Kats P., Hochstenbach R., Passier R., Sonnenberg A., Mummery C.L. 2008. Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via $\alpha V\beta 5$ integrin. *Stem Cells*, 26: 2257-2265
- Brambrink T., Foreman R., Welstead G., Lengner C., Wernig M., Suh H., Jaenisch R. 2008. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*, 2, 2: 151-159
- Buhring H. J., Battula V. L., Treml S., Schewe B., Kanz L., Vogel, W. 2007. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Annals of the New York Academy of Science*, 1106: 262-271
- Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S., Smith A. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113: 643-655
- Chambers I., Silva J., Colby D., Nichols J., Nijmeijer B., Robertson M., Vrana J., Jones K., Grotewold L., Smith A. 2007. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, 450: 1230-1234
- Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. 2007. *Nature Biotechnology*, 25, 7: 803-816
- Cheng L., Hammond H., Ye Z., Zhan X., Dravid G. 2003. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells*, 21: 131-142
- Coles B.L.K., Angénieux B., Inoue T., Del Rio-Tsonis K., Spence J.R., McInnes R.R., Arsenijevic Y., van der Kooy D. 2004. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 44: 15772-15777
- De Rooij D.G. 2003. Stem cells in the testis. *International Journal of Experimental Pathology*, 79, 2: 67-80
- Dr. W. Eustace B. Johnson. Research Institute for Science and Technology in Medicine. Keele University.
<http://www.keele.ac.uk/research/istm/johnson.htm> (26. 5. 2009)
- Edling C. E. Hallberg B. 2007. c-Kit – a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 11: 1995-1998
- Evans M., Kaufman M. 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 5819: 154-6

Friedenstein A.J., Piatetzky-Shapiro I.I., Petrakova K.V. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*, 16: 381-390

Genbacev O., Krtolica A., Zdravkovic T., Brunette E., Powell S., Nath A., Caceres E., McMaster M., McDonagh S., Li Y., Mandalam R., Lebkowski J., Fisher S.J. 2005. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertility and Sterility*, 83: 1517-1529

Gerecht S., Bettinger C.J., Zhang Z., Borenstein J.T., Vunjak-Novakovic G., Langer R. 2007a. The effect of actin disrupting agents on contact guidance of human embryonic stem cells. *Biomaterials* 28: 4068-4077

Gimble J. M., Katz A. J., Brunnell B. A. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 100: 1249-1260

Godier F.G.A., Marolt D., Gerecht S., Tajnsek U., Martens T.P., Vunjak-Novakovic G. 2008. Engineered microenvironments for human stem cells. *Birth Defects Research*, 84, 335-347

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

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

Hovatta O., Mikkola M., Gertow K., Strömbärg A.-M., Inzunza J., Hreinsson J., Rozell B., Blennow E., Andäng M., Ährlund-Richter L. 2003. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Human Reproduction*, 18: 1404-1409

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

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

Illouz Y.G. 1983. Body contouring by lipolysis: a 5-year experience with over 3000 cases. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 72, 591-597

In Vitro Fertilization Picture of Morula Stage Embryo. Advanced fertility center of Chicago.

<http://www.advancedfertility.com/morula.htm> (31. 3. 2009)

- Inzunza J., Gertow K., Stromberg M.A., Matilainen E., Blennow E., Skottman H., Wolbank S., Ährlund-Richter L., Hovatta O. 2005. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells*, 23: 544-549
- Izpadanah R., Trygg C., Patel B., Kriedt C., Dufour J., Gimble J.M., Bunnell B.A. 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99: 1286-1297
- Izadpanah R., Kaushal D., Kriedt C., Tsien F., Patel B., Dufour J., Bunnell B.A. Long-term *in vitro* expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. 2008 *Cancer Research*, 68, 11: 4229-38
- 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
- Jaenisch R., Eggan K., Humpherys D., Rideout W., Hochedlinger K. 2002. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. *Cloning and Stem Cells*, 4, 4: 389-396
- Jaenisch R., Young R. 2008. Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell*, 132: 567-582
- Jauch R., Ng C. K., Saikatendu K. S., Stevens R. C., Kolatkar P. R. 2008. Crystal structure and DNA binding of the homeodomain of the stem cell transcription factor Nanog. *Journal of Molecular Biology*, 376, 3: 758-770
- Katz A.J., Hedrick M.H., Llull R., Futrell J.W. 2001. A novel device for the simple and efficient refinement of liposuctioned tissue. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 107: 595-597
- Katz A.J., Llull R., Hedrick M.H., Futrell J.W. 1999. Emerging approaches to the tissue engineering of fat. *Clinics in Plastic Surgery*, 26: 587-603
- Kennedy S.H., Qin H., Lin L., Tan E.M. 1995. Basic fibroblast growth factor regulates type I collagen and collagenase gene expression in human smooth muscle cells. *American Journal of Pathology*, 146: 764-771
- Kilroy G.E., Foster S.J., Wu X., Ruiz J., Sherwood S., Heifetz A., Ludlow J.W., Stricker D.M., Potiny S., Green P., Halvorsen Y.D., Cheatham B., Storms R.W., Gimble J.M. 2007. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *Journal of Cellular Physiology*, 212, 3: 702-9
- Klimanskaya I., Chung Y., Becker S., Lu S.J., Lanza R. 2006. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*, 444: 481-485

- Koivisto H., Hyvärinen M., Strömberg A.-M., Inzunza J., Matilainen E., Mikkola M., Hovatta O., Teerijoki H. 2004. Cultures of human embryonic stem cells – serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor. *Reproductive BioMedicine Online*, 9: 330-337
- Kolf C. M., Cho E., Tuan R. S. 2007. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research and Therapy*, 9, 1: 204
- Kurita M.M.D., Shigeura T., Sato K., Gonda K., Harii K., Yoshimura K. 2008. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 121, 3: 1033-1041
- Langer R., Vacanti J.P. 1993. *Tissue Engineering*. *Science*, 260: 920-926
- Lavker R.M., Miller S., Wilson C., Cotsarelis G., Wei Z.-G., Yang J.-S., Sun T.-T. 1993. Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation. *Journal of Investigative Dermatology*, 101: 16S–26S
- Lee J.B., Song J.M., Lee J.E., Park J.H., Kim S.J., Kang S.M., Kwon J.N., Kim M.K., Roh S.I., Yoon H.S. 2004. Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. *Reproduction*, 128: 727-735
- Lee J.B., Lee J.E., Park J.H., Kim S.J., Kim M.K., Roh S.I., Yoon H.S. 2005. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serumfree condition. *Biology of Reproduction*, 72: 42-49
- Levenberg S., Khademhosseini A., Macdonald M., Fuller J., langer R. 2006. *Tissue Engineering: Basic Considerations*. V: Human embryonic stem cell culture for tissue engineering. Vunjak-Novakovic G., Freshney R.I. (ur.). Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 61-82
- Levenstein M.E., Ludwig T.E., Xu R.-H., Llanas R.A., VanDenHeuvel-Kramer K., Manning D., Thomson J.A. 2006. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*, 24: 568-574
- Li H.S., Yang J.M., Jacobson R.D., Pasko D., Sundin O. 1994. Pax-6 is first expressed in a region of ectoderm anterior to the early neural plate: implications for stepwise determination of the lens. *Developmental Biology*, 162, 1: 181-94
- Locatelli F., Maccario R., Frassoni F. 2007. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders? *Haematologica*, 92, 7: 872-877

- Ludwig T.E., Levenstein M.E., Jones J.M., Berggren W.T., Mitchen E.R., Frane J.L., Crandall L.J., Daigh C.A., Conard K.R., Piekarczyk M.S., Llanas R.A., Thomson J.A. 2006. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nature Biotechnology*, 24: 185-187
- Majumdar M.K., Thiede M.A., Haynesworth S.E., Bruder S.P., Gerson S.L.. 2000. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 9, 6: 841-848
- Marolt D., Augst A., Freed L.E., Vepari C., Fajardo R., Patel N., Gray M., Farley M., Kaplan D., Vunjak-Novakovic G. 2006. Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. *Biomaterials*, 27: 6138-6149
- Marshman E., Booth C., Potten C.S. 2002. The intestinal epithelial stem cell. *BioEssays*, 24, 1: 91-98
- Martin G. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 12: 7634-7638
- Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., Shimosato D., Yagi R., Takahashi K., Okochi H., Okuda A., Matoba R., Sharov A.A., Ko M.S., Niwa H. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, 9: 625-635
- 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
- McIntosh K., Zvonic S., Garrett S., Mitchell J.B., Floyd Z.E., Hammill L., Kloster A., Halvorsen Y.D., Ting J.P., Storms R.W., Goh B., Kilroy G., Wu X., Gimble J.M. 2006. The immunogenicity of human adipose derived stem cells: temporal changes *in vitro*. *Stem Cells*, 24: 1245-1253
- Meissner A., Wernig M., Jaenisch, R. 2007. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 25, 1177-1181
- Meng X., Ichim T. E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K. W., Thebaud B., Riordan N. H. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine*, 5: 57
- Meza-Zepeda LA, Noer A, Dahl JA, Micci F, Myklebost O, Collas P. 2008. High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12, 2: 553-63

- Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher L. W., Robey P. G., Shi S. 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 10: 5807-5812
- Moore J.H. Jr., Kolaczynski J.W., Morales L.M., Considine R.V., Pietrzkowski Z., Noto P.F., Caro J.F. 1995. Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: effects of local anesthesia with lidocaine. *Aesthetic Plastic Surgery*, 19, 335-339.
- Muraglia A., Perera M., Verardo S., Liua Y., Cancedda R., Quartoc R., Cortea G. 2008. DLX5 overexpression impairs osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *European Journal of Cell Biology*, 87: 751-761
- Odayrajsingh-Varma M.J., van Ham S.M., Knippenberg M., Helder M.N., Klein-Nulend J., Schouten T.E., Ritt M.J., van Milligen F.J. 2006. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*, 8: 166-177
- Oertel M., Shafritz D. A. 2008. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1782, 2: 61-74
- Park J.H., Kim S.J., Oh E.J., Moon S.Y., Roh S.I., Kim C.G., Yoon H.S. 2003. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biology of Reproduction*, 69: 2007-2014
- Pereira R.C., Economides A.N., Canalis E. 2000. Bone morphogenetic proteins induce gremlin, a protein that limits their activity in osteoblasts. *Endocrinology*, 141, 12: 4558-63
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. 1999. *Science*, 184, 5411: 143-147
- Preparation of hESC cell culture medium. Procedure# SOP-CC-001 revB. 2007. Madison, Wisconsin, ZDA, National Stem Cell Bank: 5 str.
<http://www.nationalstemcellbank.org/> (20. 5. 2009)
- Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Wysoczynski M., Wan W., Ratajczak J., Wojakowski W., Kucia M. 2008. Hunt for pluripotent stem cell – Regenerative medicine search for almighty cell. *Journal of Autoimmunity*, 30, 3: 151-162
- Reese J.S., Solchaga L.A., Lingas K.T., Gerson S.L., Lazarus H.M. 2007. FGF improves culture expansion of human mesenchymal stem cells (MSCs) for the treatment of graft *versus* host disease (GVHD). MSC 2007. Cleveland, National Center for Regenerative Medicine
<http://www.msc2007.net/abstracts/REESE.FGF.pdf> (22. 5. 2009)
- Richards M., Fong C.-Y., Chan W.-K., Wong P.-C., Bongso A. 2002. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 20: 933-936

Richards M., Tan S., Fong C.-Y., Biswas A., Chan W.-K., Bongso A. 2003. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 21: 546-556

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 (22. 5. 2009)

Rožman P., Strbad M., Knežević, M. 2007. Uporaba matičnih celic v medicini. V: Genialna prihodnost - genetika, determinizem in svoboda. Mednarodni posvet Biološka znanost in družba, Ljubljana, 4-5 okt. 2007, Ljubljana. Strgulc-Krajšek S., Popit T., Vičar M., Schrader Š. (ur.). Ljubljana, Zavod RS za šolstvo: 202-212

Rubio D., Garcia-Gastro J., Martin M.C., de le Fuente R., Cigudosa J.C., Lloyd A.C., Bernard A. 2005. A spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Research*, 65, 8: 3035-3039

Scadden D.T. 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441: 1075-1079

Sinner D., Rankin S., Lee M., Zorn A.M. 2004. Sox17 and β-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes. *Development*, 131, 3069-3080

Skottman H., Stromberg A.M., Matilainen E., Inzunza J., Hovatta O., Lahesmaa R. 2005. Unique gene expression signature by human embryonic stem cells cultured under serum free conditions correlates with their enhanced and prolonged growth in an undifferentiated stage. *Stem Cells*, 24: 151-167

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

SOX2 SRY (sex determining region Y)-box 2 [Homo sapiens], GeneID: 6657. 2008. ENZTREZ Gene (27. 7. 2008)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd>ShowDetailView&TermToSearch=6657&ordinalpos=5&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum (5. 6. 2008)

Stem cells: scientific progress and future research directions. 2001. Kirschstein R., Skirboll L.R. (ur.). Bethesda, Maryland, ZDA, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services: 106 str.

Stojkovic P., Lako M., Stewart R., Przyborski S., Armstrong L., Evans J., Murdoch A., Strachan T., Stojkovic M. 2005a. An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23: 306-314

Stojkovic P., Lako M., Przyborski S., Stewart R., Armstrong L., Evans J., Xin Z., Stojkovic M. 2005b. Human-serum matrix supports undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23: 306-314

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

Suga H., Shigeura T., Matsumoto D., Inoue K., Kato H., Aoi N., Murase S., Sato K., Gonda K., Koshima I., Yoshimura K. 2007 Rapid expansion of human adipose-derived stromal cells preserving multipotency. *Cosmetic Medicine in Japan*
<http://www.cosmetic-medicine.jp/english/list/EGM2.htm> (22. 5. 2009)

Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 4: 663-676

Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131: 861-872

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

Tissue Engineering: Basic Considerations. V: Culture of cells for tissue engineering. Vunjak-Novakovic G., Freshney R.I. (ur.). Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.: 131-155

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

Tsutsumi S., Shimazu A., Miyazaki K., Pan H., Koike C., Yoshida E., Takagishi K., Kato Y. 2001. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288, 2: 413-419

Vodyanik M.A., Slukvin I.I. 2007. Hematoendothelial differentiation of human embryonic stem cells. *Current Protocols in Cell Biology*

Vunjak-Novakovic G. 2006. Tissue Engineering: Basic Considerations. V: Culture of cells for tissue engineering. Vunjak-Novakovic G., Freshney R.I. (ur.). Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 131-155

Wang Q., Fang Z.F., Jin F., Lu Y., Gai H., Sheng H.Z. 2005. Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders derived from themselves. *Stem Cells*, 23: 1221-1227

WA13 (H13). Madison, Wisconsin, ZDA, WiCell™ Research Institute.
http://www.wicell.org/index.php?products_id=80&mCoA=0&id=&option=com_oscommerce&osMod=product_info&Itemid=130&osCsid=b0909dd4a1e76b97862ef440c675608 (20. 5. 2009)

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

- Xu C., Inokuma M.S., Denham J., Golds K.G., Kundu P., Gold J.D., Carpenter M.K. 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19: 971-974
- Xu C., Jiang J., Sottile V., McWhir J., Lebkowsky J., Carpenter M.K. 2004. Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cell support undifferentiated cell growth. *Stem Cells*, 22: 972-980
- Xu C., Rosler E., Jiang J., Lebkowski J.S., Gold J.D., O'Sullivan C., Delavan-Boorsma K., Mok M., Bronstein A., Carpenter M.K. 2005a. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells*, 23: 315-323
- Xu R.-H., Peck R.M., Li D., Feng X., Ludwig T., Thomson T.A. 2005b. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nature Methods*, 2: 185-190
- Yamaguchi T.P., Takada S., Yoshikawa Y., Wu N., McMahon A.P. 1999. *T* (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes & Development*, 13: 3185-3190
- Yoshimura K., Shigeura T., Matsumoto D., Sato T., Takaki Y., Aiba-Kojima E., Sato K., Inoue K., Nagase T., Koshima I., Gonda K. 2006. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *Journal of Cell Physiology*, 208: 64 -76
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318: 1917-1920
- Zhu Y., Liu T., Song K., Fan X., Ma X., Cui Z. 2008. Adipose-derived stem cell: A better stem cell than BMSC. *Cell Biochemistry and Function*, 26, 6: 664-675
- Zipori D. 2005. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells*, 23, 6: 719-726
- Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7, 2: 211-228
- Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. 2002. Molecular Biology of the Cell, 13, 12: 4279-4295

7.2 DRUGI VIRI

Mannello F., Tonti G.A. 2007. Concise Review: No breakthroughs for human mesenchimal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells*, 25: 1603-1609

Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448: 313-317

Skottman H., Hovatta O. 2006. Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction*, 132: 691-698

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, doc. dr. Miomirju Kneževiću, da me je med svojimi predavanji navdušil za področje medicinske biotehnologije in tkivnega inženirstva ter mi dal priložnost vstopiti v ta svet. Tudi, da mi je odprl možnost nabiranja izkušenj na odlični univerzi Columbia v New Yorku.

Posebna zahvala gre somentorici in delovni mentorici, dr. Darji Marolt, da me je v New Yorku vzela pod svoje okrilje in bila izvrstna mentorica, od katere sem se res veliko naučila. Upam, da bova še kdaj sodelovali.

Hvala tudi recenzentu prof. dr. Petru Dovču za strokovni pregled naloge.

Prof. dr. Gordani Vunjak-Novakovic, vodji laboratorija za tkivno inženirstvo in maticne celice na univerzi Columbia, se zahvaljujem, da mi je dala priložnost priti v njen laboratorij, spoznati čudovite ljudi, njihovo znanje in nabrati mnogo praktičnih izkušenj pri delu s celičnimi kulturami. Hvala tudi vsem raziskovalcem in študentom na obisku iz laboratorija prof. Vunjak-Novakoviceve, da so ustavrili prijetno in spodbudno delovno okolje.

Hvala Ricku Petkovsku, ki mi je ponudil prenočišče za prvi nekaj dni v neznanem in ogromnem New Yorku.

Hvala Nadji Polanc iz podjetja Educell, ki me je uvedla v svet celičnih tehnologij. Hvala tudi zaposlenim na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, še posebno Mojci Jež za nasvete pri oblikovanju diplomske naloge.

Prof. dr. Branki Javornik in laboratoriju Katedre za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin se zahvaljujem za prve iskušnje z delom v laboratoriju.

Hvala staršem, dedkom, babicam in ostalim sorodnikom za radodarno finančno pomoč in podporo mojega odhoda v New York.

Iskorno 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 priložnosti.