

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Matija VEBER

**IDENTIFIKACIJA MATIČNIH CELIC Z
EMBRIONALNIMI LASTNOSTMI V HUMANI
POPKOVNIČNI KRVI S PRETOČNO CITOMETRIJO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Matija VEBER

**IDENTIFIKACIJA MATIČNIH CELIC Z EMBRIONALNIMI
LASTNOSTMI V HUMANI POPKOVNIČNI KRVI S PRETOČNO
CITOMETRIJO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IDENTIFICATION OF STEM CELLS WITH EMBRYONIC
CHARACTER IN THE HUMAN CORD BLOOD USING FLOW
CYTOMETRY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

POPRAVKI

Diplomsko delo je nastalo v okviru študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v Laboratoriju za pretočno citometrijo in Laboratoriju za celično biologijo Zavoda RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani v okviru raziskovalnega programa P3-0371 Človeške matične celice – napredno zdravljenje s celicami.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 16. 09. 2010 za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miomirja Kneževiča in za recenzenta prof. dr. Petra Dovča. Naknadno je bil za somentorja diplomskega dela imenovan izr. prof. dr. Primož Rožman.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- Član: doc. dr. Miomir KNEŽEVIĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Biobanka d.o.o., Trzin
- Član: izr. prof. dr. Primož ROŽMAN
Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana
- Član: prof. dr. Peter DOVČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 04. 10. 2010

Izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Matija VEBER

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 60(043.2)=163.6
KG	biotehnologija/embrionalne matične celice/popkovnična kri/VSEL/embrionalne lastnosti/pretočna citometrija/SSEA-4/CD133
AV	VEBER, Matija
SA	KNEŽEVIĆ, Miomir (mentor)/ROŽMAN, Primož (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2010
IN	IDENTIFIKACIJA MATIČNIH CELIC Z EMBRIONALNIMI LASTNOSTMI V HUMANI POPKOVNIČNI KRVI S PRETOČNO CITOMETRIJO
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 57 str., 17 pregl., 18 sl., 1 pril., 68 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	V popkovnični krvi se nahaja maloštevilna populacija matičnih celic, ki izraža označevalce embrionalnih matičnih celic Oct-4, Nanog in SSEA-4. Nekatere izmed matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi izražajo tudi površinski označevalec CD133 in so negativne za označevalec CD45 ter za označevalce linijsko usmerjenih celic. V diplomskem delu smo želeli v vzorcih popkovnične krvi z analizo na pretočnem citometru identificirati populacijo matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi in oceniti primernost metod za njihovo izolacijo. V popkovnični krvi smo s pretočnim citometrom potrdili prisotnost celic z embrionalnimi lastnostmi. Poleg tega smo znotraj te populacije identificirali tudi celice, ki izražajo še označevalec, značilen za embrionalne matične celice SSEA-4. Z odstranjevanjem linijsko usmerjenih celic preko imunomagnetne selekcije smo v frakciji izoliranih celic uspeli povečati delež populacije celic pozitivnih za CD133 in SSEA-4 ter negativnih za označevalec CD45. Njihovo vsebnost smo uspeli še dodatno povečati z imunomagnetnim odstranjevanjem linijsko usmerjenih in CD45 pozitivnih celic. Pri osamitvi matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi smo najprej z lizo eritrocitov izolirali vse jedrne celice, nato smo z imunomagnetno selekcijo odstranili linijsko usmerjene celice ter z uporabo ločevalnika fluorescenčno označenih celic izolirali populacijo celic, pozitivnih za CD133 in negativnih za CD45 ter za označevalce linijsko usmerjenih celic. Vendar pa bi morali z dodatnimi metodami preveriti prisotnost celic z embrionalnimi lastnostmi v izolirani populaciji. Za nadaljnje preučevanje in morebitno uporabo teh celic v regenerativni medicini je potrebno postopke za njihovo izolacijo še dodatno optimizirati.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 60(043.2)=163.6
CX biotechnology/embryonic stem cell/cord blood/VSEL/embryonic characteristics/flow cytometry/SSEA-4/CD133
AU VEBER, Matija
AA KNEŽEVIĆ, Miomir (supervisor)/ROŽMAN Primož (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY 2010
TI IDENTIFICATION OF STEM CELLS WITH EMBRYONIC CHARACTER IN THE HUMAN CORD BLOOD USING FLOW CYTOMETRY
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIV, 57 p., 17 tab., 18 fig., 1 ann., 68 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Umbilical cord blood contains a small population of stem cells with embryonic character that express the embryonic stem cell markers Oct-4, Nanog, and SSEA-4. These cells also express the surface marker CD133, but lack CD45 expression along with other markers of lineage differentiation. In graduation thesis we wanted to indentify this population of stem cells with embryonic character using flow cytometry analysis and to evaluate different methods for their isolation. We confirmed the presence of an embryonic stem cell population in umbilical cord blood using flow cytometry analysis. We were also able to identify cells that express the typical embryonic stemcell marker SSEA-4. By depleting lineage-committed cells using immunomagnetic separation, we enriched the cell population within the isolated cell fraction that was positive for CD133, and SSEA-4, but negative for CD45. We managed to increase the proportion of these cells even further with the immunomagnetic depletion of lineage-committed, and CD45-positive cells. In order to extract embryonic stem cells we first isolated all nucleated cells by lysing erythrocytes, followed by removal of lineage-committed cells using immunomagnetic separation. Finally, we used fluorescence-activated cell sorting to isolate the cell population expressing CD133, but lacking CD45 and other markers of lineage differentiation. Additional tests would need to be performed in order to confirm the presence of stem cells with embryonic character in the isolated population. It is necessary to optimize the isolation procedure in order to explore the nature and possible use of these cells in regenerative medicine.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X
Slovarček	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	3
1.2 HIPOTEZA	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 MATIČNE CELICE	4
2.1.1 Potentnost matičnih celic skozi zgodnji embrionalni razvoj	4
2.1.2 Pluripotentne matične celice	5
2.1.2.1 Embrionalne karcinomske celice	7
2.1.2.2 Embrionalne matične celice	8
2.1.2.3 Matične celice epiblasta	9
2.1.2.4 Pluripotentne linije iz spolnih celic	10
2.1.2.5 Reprogramirane pluripotentne matične celice	10
2.1.3 Domnevno pluripotentne matične celice	12
2.1.3.1 Mezenhimske matične celice	13
2.1.3.2 Multipotentne prednice odraslega	14
2.1.3.3 Celice MIAMI	14
2.1.3.4 Celice hMASC	14
2.1.3.5 Embrionalne matične celice odraslega	15
2.1.3.6 Embrionalnim matičnim celicam podobne celice iz popkovnične krvi	15
2.1.3.7 Celice VSEL	15
3 MATERIAL IN METODE	18
3.1 POTEK DELA	18
3.2 MATERIAL	19
3.3 METODE	19
3.3.1 Pridobivanje vzorcev popkovnične krvi	19
3.3.2 Izolacija enojedrnih celic s fikorom	19
3.3.3 Izolacija vseh jedrnih celic z lizo eritrocitov	20
3.3.4 Določanje števila celic	21
3.3.5 Imunomagnetno ločevanje celic	21
3.3.5.1 Titracija biotiniliranega protitelesa anti-CD45	24
3.3.6 Identifikacija populacije matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi	25
3.3.6.1 Določitev območja za analizo s pretočnim citometrom	26
3.3.6.2 Izračun kompenzacije	26
3.3.7 Ločevanje fluorescenčno označenih celic	27
4 REZULTATI	29

4.1	TITRACIJA BIOTINILIRANEGA PROTITELESA ANTI-CD45	29
4.2	DOLOČANJE VSEBNOSTI MATIČNIH CELIC Z EMBRIONALNIMI LASTNOSTMI V RAZLIČNIH FRAKCIJAH POPKOVNIČNE KRVI	31
4.2.1	Število celic v različnih frakcijah popkovnične krvi	31
4.2.2	Izračun kompenzacije	31
4.2.3	Določitev območja za analizo s pretočnim citometrom	31
4.2.4	Analiza populacije matičnih celic s pretočnim citometrom	33
4.3	IZOLACIJA MATIČNIH CELIC Z EMBRIONALNIMI LASTNOSTMI V TREH KORAKIH	38
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	42
5.1	RAZPRAVA	42
5.2	SKLEPI	49
6	POVZETEK	50
7	VIRI	52
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Pregled različnih ravni pluripotentnosti.	7
Preglednica 2: Fenotip nekaterih domnevno pluripotentnih matičnih celic.	17
Preglednica 3: Nastavitve profila za štetje celic v popkovnični krvi na napravi Vi-Cell.	21
Preglednica 4: Seznam površinskih antigenov značilnih za linijsko usmerjene celice, ki jih prepozna »Diamond CD133 isolation kit«.	23
Preglednica 5: Reagenti, uporabljeni pri titraciji biotiniziranega protitelesa anti-CD45 pri imunomagnetnem ločevanju 1×10^7 celic.	24
Preglednica 6: Protitelesa, uporabljena za označevanje celic za 50 μ l vzorca.	25
Preglednica 7: Protitelesa, uporabljena za preverjanje nespecifičnih vezav protiteles za 50 μ l vzorca.	25
Preglednica 8: Vzorci, uporabljeni za izračun kompenzacije	27
Preglednica 9: Protitelesa uporabljena za označevanje celic za 50 μ l vzorca.	27
Preglednica 10: Protitelesa, uporabljena za preverjanje nespecifičnih vezav protiteles za 50 μ l vzorca	28
Preglednica 11: Delež CD45 pozitivnih celic določenih s pretočnim citometrom ter število izoliranih celic po odstranitvi linijsko usmerjenih celic z imunomagnetno selekcijo pri različnih koncentracijah biotiniziranega protitelesa anti-CD45.	29
Preglednica 12: Število celic na ml popkovnične krvi pri uporabi različnih metod izolacije.	31
Preglednica 13: Kompenzacija na pretočnem citometru za barvila FITC, APC in PE.	31
Preglednica 14: Deleži posameznih populacij celic v različnih frakcijah popkovnične krvi z upoštevanimi nespecifičnimi vezavami.	36
Preglednica 15: Predvideno število različnih populacij celic v 1 ml popkovnične krvi v frakcijah, izoliranih z različnimi metodami.	37
Preglednica 16: Število celic po različnih stopnjah izolacije matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi.	38
Preglednica 17: Analiza rezultatov na pretočnem citometru za različne populacije celic pri dveh stopnjah izolacije.	41

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Dva scenarija izvora matičnih celic odraslega.	1
Slika 2: Kompaktacija in tvorba blastociste sesalca.	4
Slika 3: Nastanek zarodnih plasti pri gastrulaciji.	5
Slika 4: Shema poteka dela.	18
Slika 5: Izolacija enojedrnih celic s sredstvom Ficoll-Paque PREMIUM.	20
Slika 6: Dvostopenjska imunomagnetna izolacija CD133 pozitivnih celic.	22
Slika 7: Odvisnost deleža CD45 pozitivnih celic od koncentracije anti-CD45 protitelesa.	30
Slika 8: Odvisnost števila izoliranih celic od koncentracije anti-CD45 protitelesa.	30
Slika 9: Prikaz analize različnih frakcij popkovnične krvi s pretočno citometrijo na podlagi označevalca CD61.	32
Slika 10: Analiza populacij celic v frakciji MNC iz popkovnične krvi na podlagi označevalcev CD45, CD133 in SSEA-4 s pretočnim citometrom.	33
Slika 11: Analiza nespecifičnih vezav protiteles proti CD133 in SSEA-4 v frakciji MNC iz popkovnične krvi. Grafi prikazujejo enake populacije celic kot slika 10.	35
Slika 12: Delež različnih populacij celic v frakcijah TNC in MNC iz popkovnične krvi.	36
Slika 13: Delež različnih populacij celic v frakcijah Lin ⁻ in Lin ⁺ , CD45 ⁻ iz popkovnične krvi.	37
Slika 14: Predvideno število celic različnih populacij v 1 ml popkovnične krvi v frakcijah, izoliranih z različnimi metodami.	38
Slika 15: Analiza različnih populacij celic s pretočnim citometrom v izhodiščni populaciji TNC na podlagi označevalcev CD45, Lin, CD133 in SSEA-4.	39
Slika 16: Analiza nespecifičnih vezav v izhodiščni populaciji TNC.	40
Slika 17: Analiza različnih populacij celic s pretočnim citometrom v frakciji Lin na podlagi označevalcev CD45, Lin, CD133 in SSEA-4.	40
Slika 18: Analiza nespecifičnih vezav v frakciji Lin ⁻ .	41

KAZALO PRILOG

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

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APC	alofikocianin
bFGF	bazični rastni dejavnik fibroblastov (angl. basic fibroblast growth factor)
BMP	protein kostne morfogeneze (angl. bone morphogenic protein)
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
CD	označevalec pripadnosti (angl. cluster of differentiation)
cDNA	komplementarna DNA
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
D-PBS	Dulbeccov fosfatni pufer (angl. Dullbeco's phosphate buffered saline)
EC celica	embrionalna karcinomska celica (angl. embryonic carcinoma cell)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
EG celica	embrionalna germinalna celica
EMC	embrionalna matična celica
EpiMC	matična celica iz epiblasta (angl. epiblast stem cell)
ESC-A	embrionalne matične celice odraslega (angl. embryonic stem cells of the adult)
FACS	ločevalnik fluorescenčno označenih celic (angl. fluorescence activated cell sorter)
FBS	fetalni goveji serum (angl. fetal bovine serum)
FITC	fluorescein izotiacianat
FSC	prednje sipanje svetlobe (angl. forward scatter)
HLA	humani levkocitni antigen (angl. human leukocyte antigen)
hMASC	angl. human multipotent adult stem cell
ICM	notranja celična masa (angl. inner cell mass)
iPS celica	inducirana pluripotentna matična celica (angl. induced pluripotent stem cell)
JAK/STAT3	angl. Janus kinase signal transducer and activator of transcription
KMC	krvotvorna matična celica
LIF	levkemični inhibitorni faktor
Lin ⁺ celica	linijsko usmerjena celica
Lin ⁻ celica	linijsko neusmerjena celica
MAPC	multipotentna prednica odraslega (angl. multipotent adult progenitor cell)

MASC	multipotentna spermatogonijska matična celica odraslega (angl. multipotent adult spermatogonial stem cell)
MC	matična celica
mGMC	multipotentna matična celica iz germinalne linije (angl. multipotent germ line stem cell)
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (angl. major histocompatibility complex)
MIAMI	angl. marrow isolated multilineage inducible cell
MMC	mezenhimska matična celica oziroma multipotentna stromalna celica (angl. mesenchymal stem cell, multipotent stromal cell)
MNC	enojedrna celica (angl. mononuclear cell)
mRNA	informacijska RNA (angl. messenger RNA)
Oct-4	oktamer 4 (angl. octamer-binding transcription factor 4)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PE	fikoeritrin
PGC	primordialna germinalne celice
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
RT-PCR	reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (angl. reverse transcription polymerase chain reaction)
SCF	dejavnik matičnih celic (angl. stem cell factor)
SCID	huda kombinirana imunska pomanjkljivost (angl. severe combined immunodeficiency disease)
SCNT	prenos jedra somatske celice (angl. somatic cell nuclear transfer)
Sox-2	angl. sex determining region Y-box 2
SSC	stransko sipanje svetlobe (angl. side scatter)
SSEA	angl. stage-specific embryonic surface antigen
TGFβ	transformirajoči rastni dejavniki beta (angl. transforming growth factor beta)
TNC	vse jedrne celice (angl. total nucleated cells)
VSEL	zelo majhne celice, podobne embrionalnim matičnim celicam (angl. very small embryonic-like stem cells)

SLOVARČEK

Pojem	Obrazložitev
Alogenski	Tkivo, celice ali organ drugega osebkta iste biološke vrste, ki pa je genetsko različen in zato tudi imunsko neskladen.
Asimetrična celična delitev	Celična delitev, pri kateri nastaneta dve različno diferencirani hčerinski celici, od katerih je ena enaka svoji prednici in ohranja njeno matičnost, druga pa je bolj diferencirana.
Avtologen	Tkivo, celice ali organ, ki jih presadimo istemu osebkku, ki jih je daroval.
Banka popkovnične krvi	Ustanova, ki zbira, obdeluje in shranjuje popkovnično kri za kasnejšo uporabo.
Blastocista	Stopnja embrionalnega razvoja zarodka tik pred koncem brazdanja, pri človeku je to 4. – 5. dan po oploditvi, sestavlja jo od 80 – 150 celic.
Diferenciacija	Proces, v katerem se manj specializirana celica razvije v bolj specializirano.
Embriogeneza	Razvoj zarodka ali prenatalni razvoj osebkta.
Embrioidno telesce	Okrogel skupek celic, ki nastane iz embrionalnih matičnih celic, če jih gojimo v suspenzijski kulturi.
Embrionalne matične celice	Pluripotentne matične celice, ki jih najdemo v zgodnjem zarodku – blastocisti in jih lahko izoliramo iz notranje celične mase, preden ta začne v procesu gastrulacije tvoriti klične liste.
Embrionalne germinalne celice	Pluripotentne celice, ki izhajajo iz zgodnjih spolnih (germinalnih) celic. Po svojih značilnostih so zelo podobne embrionalnim matičnim celicam.
Embrionalne karcinomske celice	Pluripotentne maligno spremenjene celice, ki jih vsebujejo teratokarcinomi.
Embrionalne matične celice odraslega	Pluripotentne celice z lastnostmi embrionalnih matičnih celic, ki jih lahko najdemo v odraslem organizmu. Prvič so jih izolirali iz površinskega epitelija jajčnika pri ženskah brez naravno prisotnih foliklov in jajčnih celic, nahajajo pa se verjetno tudi v kostnem mozgu in drugih organih.
Epiblast	Epiblast je tkivo, ki nastane iz notranje celične mase blastociste, pri človeku je to okrog 6. dneva po oploditvi. Leži med trofoblastom in hipoblastom, ki meji na blastocel.
Genetsko vtisnenje	Genetsko vtisnenje je vrsta epigenetske spremembe, za katero je značilen nov vtisk v genom (v razvoju vzpostavljen vzorec metilacije DNA). Poteka pri dedovanju genoma od dveh staršev, od katerih vsak daruje eno spolno celico – jajce ali semenčico, v

	kateri je dedni material dodatno označen. Pri tem nosi vsak maternalni oz. paternalni kromosom oznako v obliki posebnega vzorca metilacije.
Germinalne celice	Spolne celice oz. vse predniške celice, ki se lahko diferencirajo bodisi v moške ali ženske spolne celice.
Himera	Osebek, sestavljen iz celic, ki izhajajo iz dveh ali več različnih zigot.
<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> je besedna zveza, ki se v naravoslovju nanaša na procese v epruveti oziroma v umetnem okolju (laboratoriju).
<i>In vivo</i>	V živem osebkcu oz. v naravnem okolju.
Inducirane pluripotentne matične celice	Vrsta pluripotentnih celic, ki jih umetno pridobimo iz diferenciranih odraslih somatskih celic. Celice iPSCs so pridobili s transfekcijo somatskih celic z zgodnjimi embrionalnimi geni, ki se značilno močno izražajo v pluripotentnih embrionalnih matičnih celicah.
Krvotvorna matična celica	Krvotvorna matična celica (KMC) je multipotentna matična celica v kostnem mozgu, iz katere nastanejo eritrociti, levkociti in trombociti.
Lin- (Lin+)	Izraza Lin- oz. Lin+ označujeta populacijo celic, ki je Lin-negativna oz. Lin-pozitivna, pri čemer pomeni izraz Lin+ tiste celične označevalce (večinoma molekule CD), ki jih imajo bolj diferencirane in linijsko usmerjene krvne celice, ki nastajajo iz krvotvornih matičnih celic.
Multipotentna celica prednika odraslega (MAPC)	Vrsta pluripotentnih celic iz kostnega mozga, ki imajo določene lastnosti embrionalnih matičnih celic, ki jih lahko diferenciramo v hondrocite, adipocite in kostne celice.
Matična celica odraslega	Nediferencirana matična celica, ki jo v majhnem številu najdemo v različnih tkivih in organih ploda ali odrasle osebe.
Mezenhimska matična celica	Mezenhimske matične celice spadajo med stromalne celice kostnega mozga in imajo dvojno vlogo: a) predstavljajo izvor celic nekrvotvornih tkiv in b) so hkrati hranilne in podporne celice za rast in diferenciacijo krvnih celic in ostalih tkiv.
MIAMI (celice)	Celice MIAMI so velike od 7-10 µm, imajo malo citoplazme in se hitro delijo. So pluripotentne in so jih opazovali le nekateri avtorji. Morfologija celic ostaja enaka tudi po 52 podvojitvah. <i>In vitro</i> so se celice MIAMI sposobne diferencirati v vse tri embrionalne plasti.
Multipotentna matična celica	Multipotentna matična celica je celica z manjšo potentnostjo in sposobnostjo diferenciacije v primerjavi s pluripotentno in totipotentno matično celico. Multipotentna celica lahko tvori različne tipe celic, ki pa vsi pripadajo istemu ključnemu listu.

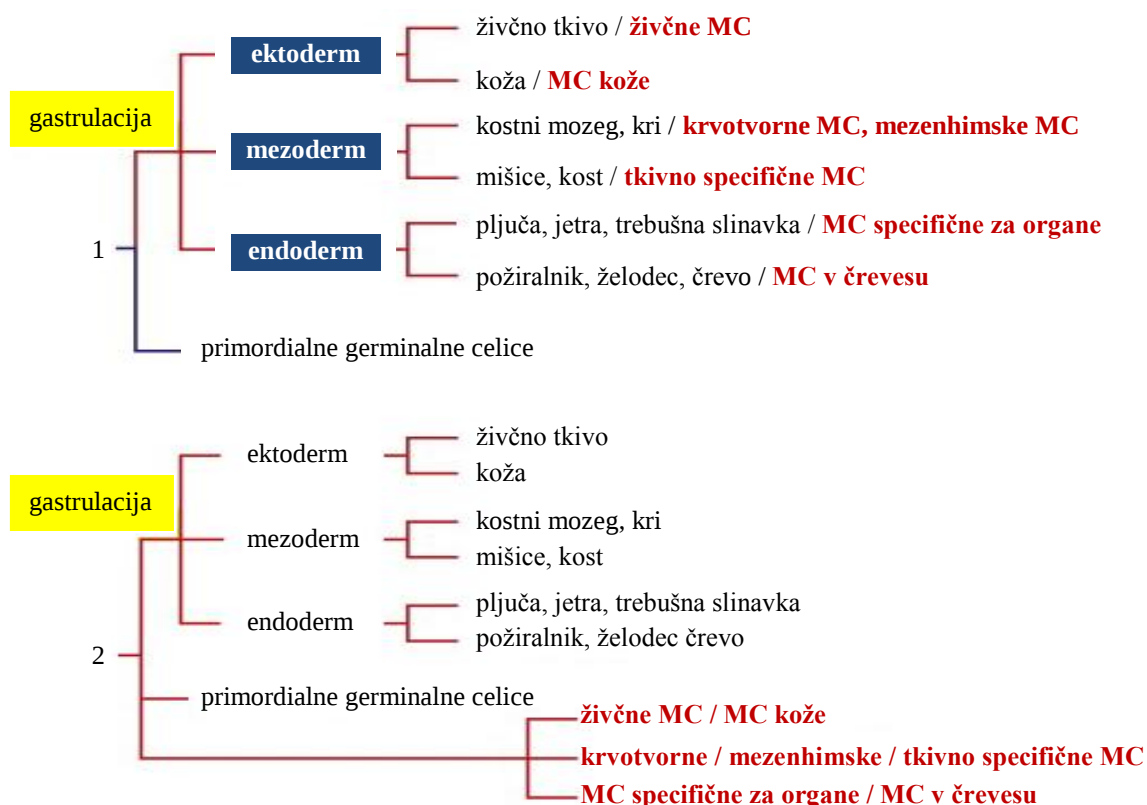
Označevalec	V celični biologiji uporabljamo ta izraz za genotipske (določeni specifični geni) ali fenotipske (določene specifične beljakovine) označevalce, ki so značilni za določen tip celic. Nahajajo se lahko na površini celice, v citoplazmi ali v celičnem jedru.
Pluripotentna matična celica	Celica, sposobna tvoriti vse telesne celice, vključno z germinalnimi celicami.
Popkovnična kri	Kri, zbrana iz popkovnične vene ali dveh popkovničnih arterij takoj po porodu. Popkovnična kri vsebuje predvsem krvotvorne matične celice ter predniške celice eritrocitov, levkocitov in trombocitov, v manjši meri pa tudi nekaj drugih vrst matičnih celic.
Potentnost	Sposobnost matičnih celic za diferenciacijo.
Ločevalnik fluorescenčno označenih celic	Naprava, ki lahko hitro ločuje celice v suspenziji glede na njihovo velikost ali barvo, s katero so označene.
Primordialna germinalna celica	Primitivna, zgodnja, nezrela spolna celica.
Regenerativna medicina	Veja medicine, ki se ukvarja z obnovo fizioloških funkcij organov in tkiv in pri tem lahko uporablja tudi <i>in vitro</i> gojene celice, metode tkivnega inženirstva, različne naravne rastne dejavnike in druge biotehnološke metode.
Samoobnavljanje	Posebna sposobnost matične celice, da s celično delitvijo nastane vsaj ena hčerinska celica, ki je popolnoma enaka materinski in ima enako latentno sposobnost diferenciacije.
SCID	Je huda kombinirana imunska pomanjkljivost. Bolezen nastane zaradi nedelujočih T- in B- limfocitov.
Simetrična celična delitev	Celična delitev, pri kateri nastaneta dve enaki hčerinski celici.
Telomeraza	Encim v evkariontskih celicah, ki podaljšuje konce kromosomov (telomere) ob celičnih delitvah. Tako preprečuje njihovo degeneracijo oz. staranje.
Totipotentna matična celica	Celica, sposobna tvoriti celoten organizem, vključno z ekstraembrionalnim tkivom (trofoblast).
Unipotentna celica	Celica, ki je sposobna le razvoja v eno celično linijo.
VSEL	Zelo majhne celice, podobne embrionalnim matičnim celicam. Odkrili so jih v kostnem mozgu in drugih tkivih. Kažejo določene embrionalne lastnosti, in vitro so jih diferencirali v tkiva vseh treh embrionalnih plasti. Domnevajo, da izhajajo iz embrionalnega razvoja in stalno naseljujejo določene dele organizma.

(Rožman in Jež, 2010)

1 UVOD

Odraslo človeško telo je sestavljeno iz več kot 200 različnih tipov celic, ki tvorijo različna tkiva in organe ter tako zagotavljajo vse potrebne funkcije za življenje. Vendar se večina celic v telesu ni sposobna podvajevati na način, da bi lahko nadomestile mrtve ali poškodovane celice ter tako ohranjale funkcionalnost tkiva. To funkcijo v večini opravlja majhno število matičnih celic, ki so v procesu samoobnavljanja sposobne z asimetričnimi celičnimi delitvami tvoriti sebi enake celice na eni in hčerinske celice na drugi strani. Te se nato diferencirajo v specifične tipe celic. Matične celice lahko s simetričnimi celičnimi delitvami, kjer tvorijo dve sebi enaki celici, svoje število tudi povečujejo (Watt in Driskell, 2010).

Glede na izvor lahko matične celice razdelimo na embrionalne, fetalne in matične celice odraslega. Embrionalne matične celice izvirajo iz zgodnjih faz razvoja zarodka in imajo širok diferenciacijski potencial, saj se iz njih razvijejo vse celice v odraslem osebk. Fetalne matične celice najdemo v zarodku in v popkovnični krvi, matične celice odraslega pa se nahajajo v vseh tkivih odraslega človeka. Izvor matičnih celic v odraslih tkivih je še vedno nerazjasnjen. Po prvem scenariju (Slika 1) se matične celice razvojno usmerijo že zgodaj v embrionalnem razvoju ob gastrulaciji, ko se izoblikujejo tri zarodne plasti: endoderm, mezoderm in ektoderm, iz katerih se razvijejo vsa tkiva v odraslem človeku. Tako bi lahko matične celice odraslega tvorile samo celice in tkiva znotraj zarodne plasti, iz katere izhajajo. Po drugem scenariju (Slika 1), pa se del matičnih celic zgodaj v embrionalnem razvoju izognej usmeritvi in se nato naseli v specifične niše v tkivih in organih. Takšne matične celice bi imele večji diferenciacijski potencial, saj ne bi bile linijsko usmerjene (Melton in Cowen, 2009).



Slika 1: Dva scenarija izvora matičnih celic odraslega (Melton in Cowen, 2009).

Embrionalne matične celice s svojim velikim diferenciacijskim in proliferacijskim potencialom ponujajo mnoge možnosti za uporabo v regenerativni medicini. Omogočajo namreč, da jih *in vitro* namnožimo v velikih količinah in diferenciramo v katerikoli tip celic. Vendar pa ima uporaba embrionalnih matičnih celic v terapevtske namene določene omejitve. Njihovo pridobivanje je etično sporeno in je v preteklosti v javnosti sprožalo burne polemike. Poleg tega uporaba embrionalnih matičnih celic lahko povzroči nastanek tumorjev, zato je potrebno nameniti posebno pozornost tudi tej tematiki. Embrionalne matične celice so ponavadi alogenske in ob vnosu v organizem sprožijo zavrnitvene reakcije. Reprogramiranje odraslih matičnih celic v stanje, podobno embrionalnim matičnim celicam, sicer omogoča pridobivanje avtolognega vira celic z velikim diferenciacijskim potencialom. Vendar za zdaj tehnologija pridobivanja takih celic onemogoča njihovo varno uporabo v terapevtske namene. Poleg tega možnost tvorbe tumorjev predstavlja enako oviro kot v primeru embrionalnih matičnih celic (Leeb in sod., 2010).

V zadnjem času so bile v odraslih tkivih odkrite tudi matične celice z razširjeno diferenciacijsko sposobnostjo, ki kažejo podobne lastnosti kot embrionalne matične celice. Obstoj teh celic bi potrdil hipotezo, da se matične celice odraslega v embrionalnem razvoju izognejo linijski usmeritvi (Slika 1, primer 2). Tako obstaja možnost, da lahko iz odraslega osebk pridobimo celice, ki izkazujejo velik potencial za uporabo v terapevtske namene. Hkrati nismo soočeni s problemi, ki se pojavljajo pri uporabi embrionalnih matičnih celic. Vendar so matične celice z embrionalnimi lastnostmi v tkivih odraslega človeka zelo maloštevilne, zato sta njihova identifikacija in izolacija zelo zahtevni. Za njihovo raziskovanje in nadaljnjo uporabo v terapevtske namene je ključno, da se razvijejo bolj učinkovite metode za izolacijo tako majhnega števila celic (Leeb in sod., 2010).

Popkovnična kri predstavlja enega najbolj dosegljivih virov matičnih celic pri človeku, ker je zaradi velikega števila rojstev in neinvazivne metode odvzema na voljo v razmeroma velikih količinah. Matične celice iz popkovnične krvi v primerjavi s tistimi iz odraslih tkiv kažejo večji proliferacijski potencial, manjšo možnost prenosa bolezni in pri alogenskih presaditvah tudi ob siceršnjem neskladju HLA povzročajo manj zavrnitvenih reakcij. S pojavom bank za shranjevanje popkovnične krvi pa lahko predstavlja tudi avtologen vir celic. Poleg tega se v popkovnični krvi prav tako nahajajo tudi matične celice z embrionalnimi lastnostmi, ki bi lahko predstavljale osnovo za nove terapevtske aplikacije (Leeb in sod., 2010; Rožman in sod., 2007).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je vzpostaviti protokol za ovrednotenje vsebnosti matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi v popkovnični krvi. V populacijah popkovnične krvi, izoliranih na različne načine, smo želeli preveriti vsebnost matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi in določiti, katera metoda bi bila najprimernejša za njihovo izolacijo. Želeli smo tudi preveriti, ali lahko iz popkovnične krvi z uporabo imunomagnetne selekcije in ločevalnika fluorescenčno označenih celic učinkovito izoliramo celice z embrionalnimi lastnostmi.

1.2 HIPOTEZA

Naše delovne hipoteze so bile:

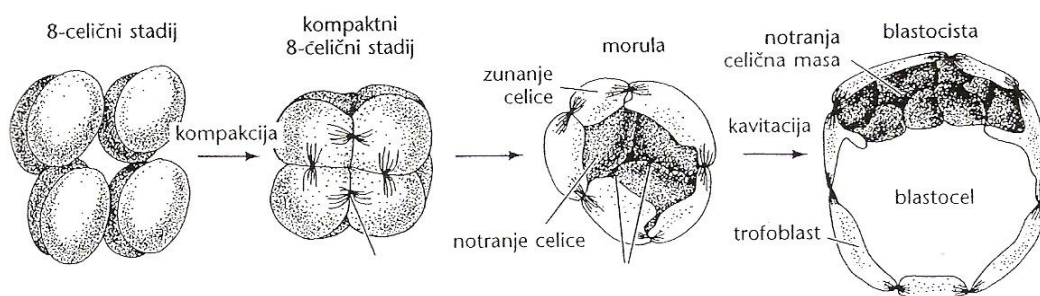
- v popkovnični krvi se nahajajo celice z embrionalnimi lastnostmi, ki jih lahko v frakciji izoliranih jedrnih celic identificiramo s pretočno citometrijo,
- s postopkom imunomagnetne selekcije linijsko neusmerjenih celic lahko povečamo vsebnost matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi v frakciji izoliranih celic iz popkovnične krvi,
- z izolacijo jedrnih celic, uporabo imunomagnetne selekcije in ločevalnika fluorescenčno označenih celic lahko izoliramo matične celice z embrionalnimi lastnostmi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MATIČNE CELICE

2.1.1 Potentnost matičnih celic skozi zgodnji embrionalni razvoj

Matične celice se med seboj razlikujejo po sposobnosti diferenciacije v različne tipe celic. Razvrstimo jih lahko v naslednje skupine z različnim diferenciacijskim potencialom: totipotentne, pluripotentne, multipotentne in mono- oziroma unipotentne. Spreminjanje potentnosti celic najlažje spremljamo skozi embrionalni razvoj organizma. Z združitvijo moške in ženske spolne celice nastane zigota, ki je najprimitivnejša totipotentna celica. Iz nje se razvije celotni organizem, vključno z izvenembrionalnimi membranami in placento. Prve blastomere, ki nastanejo iz zigote v procesu brazdanja, po prvih delitvah ohranijo totipotentnost. Če blastomere med sabo ločimo, se lahko iz vsake razvije nov zarodek (Tarkowski, 1959), kar je razvidno tudi iz pojava enojajčnih dvojčkov (Ratajczak in sod., 2007b). V 8-celičnem stadiju pride do kompaktacije, pri čemer se razdalje med celicami zmanjšajo, tako da tvorijo kompaktno kroglico. V 16-celičnem stadiju takšno skupino celic imenujemo morula, ki jo sestavlja majhno število notranjih celic in večje število zunanjih celic. V naslednjih stadijih se ti dve skupini celic dokončno ločita, kar predstavlja prvo diferenciacijo pri embrionalnem razvoju sesalcev. Zunanja plast celic tvori trofoblast, ki ne prispeva k razvoju zarodka, ampak se iz njega razvije horion, embrionalni del placent. Iz notranje plasti celic z imenom notranja celična masa (ICM – angl. inner cell mass) se razvije zarodek (Gilbert, 2000). Celice notranje celične mase so zgolj pluripotentne, saj iz njih ne more nastati placenta, ki je nujna za normalen razvoj organizma. Pluripotentne celice tako lahko prispevajo k razvoju vseh treh zarodnih plasti (endoderm, mezoderm in ektoderm), ne morejo pa tvoriti trofoblasta (Ratajczak in sod., 2007b). V procesu kavitacije celice morule izločajo tekočino v notranjost embrija ter tako nastane votlina, imenovana blastocel. ICM se potisne ob ovoj celic trofoblasta in tako nastane struktura, imenovana blastocista (Slika 2). Tudi v blastocisti se tako nahajata dve skupini celic: ICM in trofoblast (Gilbert, 2000), od katerih so celice ICM pluripotentne, celice trofoblasta pa se lahko razvijejo zgolj v izvenembrionalna tkiva (Ratajczak in sod., 2007b).

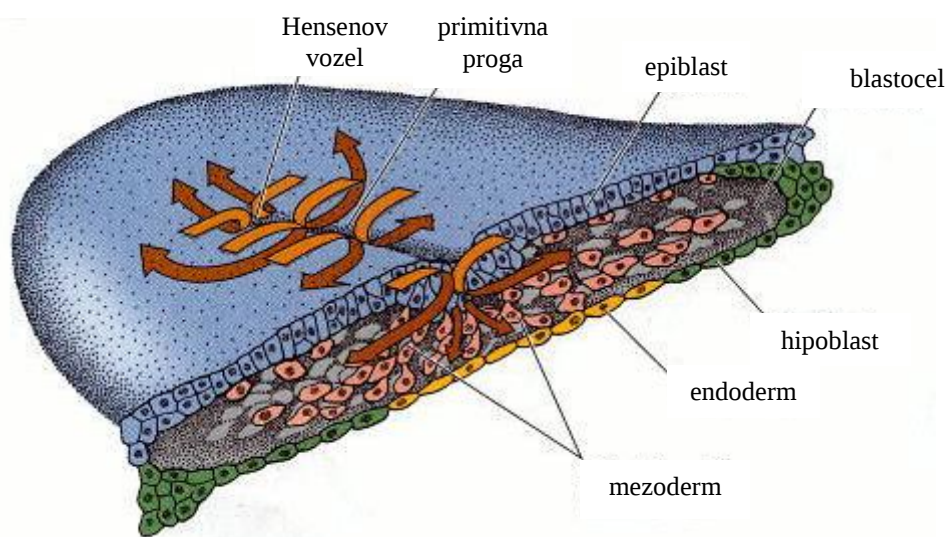


Slika 2: Kompaktacija in tvorba blastociste sesalca (Kos in Bulog, 1995).

Pred gastrulacijo poteče preoblikovanje blastociste. Plast celic v ICM, ki se nahaja bližje blastocelu, se loči od ostalih celic in tvori hipoblast oziroma primitivni endoderm. Ta iz notranje stani obda blastocel in tvori izvenembrionalni endoderm, iz katerega nastane rumenjaka vrečka, ter tako ne prispeva k razvoju embrionalnih tkiv. Preostali del ICM nad hipoblastom se imenuje epiblast. Skupino celic, iz katere se bo razvil zarodek, zato

imenujemo embrionalni epiblast. Na vrhu epiblasta pa se iz druge skupine celic tvori amnion kot obloga okoli amnijske votline, ki jo napolni amnijska tekočina (Gilbert, 2000). Celice epiblasta so tako kot celice ICM pluripotentne (Ratajczak in sod., 2007b).

Osrednja struktura, ob kateri poteka naslednja stopnja embrionalnega razvoja, ki se imenuje gastrulacija, je primitivna prog. Ta nastane s potovanjem celic iz roba posteriornega dela epiblasta proti sredini. Ko celice izoblikujejo primitivno prog, se ta iz posteriornega dela epiblasta pomakne proti anteriornemu. Na anteriornem delu primitivne proge je razširitev, ki jo imenujemo Hensenov voz. Takoj ob nastanku primitivne proge in Hensenovega vozla začnejo celice epiblasta preko teh dveh struktur potovati proti blastocelu. Celice v notranjost potujejo posamično in ne kot celotne plasti. Ena skupina celic, ki pride v blastocel preko primitivne proge, izrine hipoblast in na njegovem mestu tvori plast celic, iz katere se razvije endoderm embrija ter del izvenembrionalnih membran. Druga skupina celic se razširi v blastocel med epiblast in hipoblast ter tvori rahlo plast celic, iz katere se razvije mezoderm embrija in mezodermalni del izvenembrionalnih membran. Celice, ki ostanejo na površini, tvorijo ektoderm embrija (Gilbert, 2000). Tako dobimo po gastrulaciji tri ločene zarodne plasti celic: ektoderm, mezoderm in endoderm. V vsaki izmed njih se nahajajo multipotentne matične celice, ki lahko tvorijo samo tkiva, značilna za zarodno plast, iz katere izhajajo.



Slika 3: Nastanek zarodnih plasti pri gastrulaciji (Gilbert, 2000).

V nadaljnjem razvoju zarodka se preko organogeneze izoblikujejo vedno bolj diferencirani celični tipi, kar vodi do končne diferenciacije celic, ki sestavljajo tkiva in organe. Tu se nahajajo tkivno specifične unipotentne matične celice, ki so sposobne diferenciacije v samo en celični tip, a še niso izgubile zmožnosti samoobnavljanja (Ratajczak in sod., 2007b).

2.1.2 Pluripotentne matične celice

Že zgoraj smo omenili, da so pluripotentne matične celice navadno definirane kot celice, ki so sposobne diferenciacije v vse celice zarodka, a ne morejo tvoriti izvenembrionalnih tkiv. Nekatere novejšje definicije sicer pripisujejo pluripotentnim celicam tudi zmožnost

diferenciacije v trofoektoderm, vendar brez sposobnosti samostojnega razvoja v organizem. V posebnih okoliščinah je bilo namreč dokazano, da lahko celice, ki izvirajo iz ICM, prispevajo k razvoju trofoblasta (Niwa, 2007). A vseeno v literaturi prevladuje uporaba prve definicije in tako med pluripotentne matične celice uvrščamo celice, ki izvirajo iz embrionalnih struktur, kot so blastomere, ICM, epiblast in primordialne germinalne celice, ali pa iz odraslih spolnih celic (Jaenisch in Young, 2008). Pluripotentne matične celice lahko ustvarimo tudi z reprogramiranjem somatskih celic (Bang in Carpenter, 2009).

Da bi lahko neke celice označili kot pluripotentne, moramo torej izhajati iz definicije in dokazati, da se iz njih lahko razvijejo funkcionalne celice, ki so sposobne prispevati k razvoju celotnega organizma, to je vseh treh ključnih listov, vključno s tvorbo funkcionalnih spolnih celic. Na mišjih celicah to naredimo tako, da označene celice injiciramo v blastocisto in opazujemo razvoj himernega organizma. Ob uspešnem prispevku k razvoju organizma vnesene celice lahko tvorijo tudi spolne celice, ki ob oploditvi dajo normalne potomce (Smith in sod., 2009). Vendar lahko ob tem gostiteljeve celice prikrijejo morebitne epigenetske spremembe preiskovanih celic, ki bi drugače onemogočale normalen razvoj organizma (Jaenisch in Young, 2008). Zato je v uporabi še bolj prepričljiv test za ocenjevanje pluripotentnosti, pri katerem s fuzijo dveh blastomer v 2-celičnem stadiju povzročimo razvoj tetraploidne blastociste. Takšna blastocista se lahko uspešno ugnezdi v maternico in razvije trofoektoderm, vendar pa je razvoj zarodka zaradi tetraploidnosti onemogočen. Z vnosom pluripotentnih matičnih celic v takotetraploidno blastocisto bi tako omogočili normalen razvoj embrija izključno iz vnesenih celic (Smith in sod., 2009).

Pri raziskovanju človeških pluripotentnih celic takšni pristopi zaradi etičnih zadržkov seveda niso izvedljivi. Za ocenjevanje pluripotentnosti humanih celic se uporablja preverjanje tvorbe teratomov, v katerih se preiskovane celice *in vivo* diferencirajo v vse tri zarodne plasti. V SCID miš z oslabljenim imunskim odzivom se injicira celice, ki se nato razvijejo v teratome, ki vsebujejo mezoderm, ektoderm in endoderm. Bistvena pomanjkljivost metode je v tem, da ne preverja sposobnosti normalnega razvoja celic. Poleg testov *in vivo* lahko pluripotentnost preverjamo tudi *in vitro*, tako da preko embrioidnih teles, ki jih tvorijo celice v suspenzijski kulturi, ocenjujemo diferenciacijo v vse tri zarodne plasti. To lahko storimo tudi z neposredno diferenciacijo v določen celični tip, preko dodajanja specifičnih rastnih faktorjev in pogojev gojenja v kulturi (Smith in sod., 2009).

Pluripotentnost je možno oceniti tudi s pomočjo označevalcev, značilnih za pluripotentne matične celice. Največkrat se z imunocitokemijskimi metodami in RT-PCR preveri izražanje površinskih označevalcev in transkripcijskih faktorjev, ki sodelujejo pri vzdrževanju pluripotentnosti. Za ocenjevanje pluripotentnosti pa nam mnogokrat veliko pove že sam izgled kulture in morfologija celic. Nediferencirane celice imajo visoko razmerje med površino jedra in citoplazme, izrazita jederca in tvorijo večplastne kolonije. Poleg tega imajo pluripotentne celice značilno zgradbo jedra in obliko kromatina ter se zaradi skrajšane G1 faze celičnega cikla hitro delijo (Smith in sod., 2009).

Pluripotentnost lahko razdelimo na štiri nivoje, predstavljene v preglednici 1, ki jih ocenjujemo z uporabo različnih testov. Vsak ima svoje prednosti in slabosti ter nam na

svoj način osvetli pluripotentnost. Potrebno je presoditi, kaj hočemo dokazati, in si za dosego cilja izbrati najprimernejšo metodo (Smith in sod., 2009).

Preglednica 1: Pregled različnih ravni pluripotentnosti (Smith in sod., 2009: 25).

Raven pluripotentnosti	Test	Rezultat	Prednosti	Slabosti
Celična pluripotentnost	Morfologija celic in kolonij Določanje označevalcev, pretočna citometrija Analiza celičnega cikla	Kaže na podobne značilnosti, kot jih imajo embrionalne matične celice	Najhitrejši, testi nudijo pregled celotne kulture	Testi so nespecifični Označevalci so pogosto izraženi tudi v celicah, ki niso pluripotentne
Molekularna pluripotentnost	RT-PCR Analiza z mikročipi Epigenetska analiza	Določi, ali so celice nediferencirane	Večina testov je relativno hitrih in uporabnih za primerjavo več celičnih linij	Testi ne definirajo pluripotentnosti dovolj natančno Ne določijo sposobnosti diferenciacije
Funkcionalna pluripotentnost	Tvorba embrioidnih teles Tvorba teratomov Usmerjena diferenciacija	Preverja sposobnost diferenciacije celic v vse tri zarodne plasti	Prikazuje širok diferencijski potencial in sposobnost diferenciacije v specifične tipe celic	Tvorba embrioidnih teles ne prikazuje izoblikovanja v strukture ali tkiva Tvorba teratomov je dolgotrajen postopek in poleg tega potrjen mnogim spremenljivkam Testi ne prikazujejo nujno razvojne pluripotentnosti
Razvojna pluripotentnost	Tvorba himer Dopolnitev tetraploidne blastociste	Preverja sposobnost razvoja celic v vse celične tipe odraslega organizma, vključno s spolnimi celicami	Najstrožji test pluripotentnosti	Zaradi etičnih zadržkov ni izvedljiv na humanih celicah

2.1.2.1 Embrionalne karcinomske celice

Prve odkrite pluripotentne matične celice so bile embrionalne karcinomske celice (EC celice, angl. embryonic carcinoma cells). Izolirali so jih iz teratokarcinomov, malignih

tumorjev spolnih celic. Teratokarcinomi so sestavljeni iz celic, diferenciranih v vse tri zarodne linije, in iz nediferenciranih matičnih celic – EC celic (Bang in Carpenter, 2009). Prvotno so bili odkriti na mišjih tumorjih testisov, kjer lahko pride zaradi vsebnosti EC celic do ponovne tvorbe tumorja po transplantaciji med mišmi. Zaradi sposobnosti samoobnavljanja in diferenciacije v vse tri zarodne plasti ter možnosti gojenja *in vitro* so služile kot model embrionalnega razvoja miši. Z vnosom v blastocisto EC celice sicer prispevajo k razvoju mnogih somatskih tipov celic, vendar je ta njihova sposobnost okrnjena zaradi genetskih sprememb, ki nastanejo pri razvoju in rasti teratokarcinomov (Yu in Thomson, 2008).

Kasneje so bile odkrite tudi humane EC celice, vendar se je izkazalo, da izražajo drugačne površinske označevalce od mišjih EC celic. Mišje EC celice izražajo SSEA-1, medtem ko humane izražajo SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 in TRA-1-81. Ali so te razlike posledica funkcionalnih razlik med celičnima linijama, še vedno ni jasno. Za razliko od mišjih EC celic so humane EC celice aneuploidne, zaradi česar sta omejena njihova sposobnost razvoja v somatske linije in uporaba kot modela embrionalnega razvoja človeka (Yu in Thomson, 2008).

2.1.2.2 Embrionalne matične celice

Odkritje, da mišji zarodki, če jih prenesemo iz maternice v druga tkiva, tvorijo teratokarcinome, je dalo slutiti, da se v mišjih zarodkih nahaja pluripotentna populacija celic. To je vodilo v iskanje primernih pogojev za gojenje pluripotentnih celičnih linij neposredno iz zarodka in ne preko vmesne tvorbe teratokarcinomov (Yu in Thomson, 2008). Prve embrionalne matične celice (EMC) so bile izolirane leta 1981 iz ICM mišjih blastocist in gojene na hranilni plasti iz inaktiviranih mišjih fibroblastov v mediju z dodatkom seruma (Evans in Kaufman 1981; Martin 1981). Celice imajo neomejeno sposobnost samoobnavljanja in možnost diferenciacije v vse tri zarodne plasti. Z vnosom v blastocisto se razvijejo v vse celične tipe, vključno s spolnimi celicami, in tako tvorijo himerni organizem. Zaradi možnosti genske modifikacije se EMC uporabljajo za ustvarjanje gensko spremenjenih miši in tako predstavljajo pomembno orodje pri razvoju genetike (Bang in Carpenter, 2009).

Leta 1998 so Thomson in sodelavci (1998) izolirali prvo humano linijo EMC iz ICM odvečnih zarodkov, ki nastanejo pri postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo. Tako kot mišje EMC tudi humane ostanejo kariotipsko nespremenjene po dolgotrajnem gojenju v kulturi in hkrati ohranijo potencial za diferenciacijo v vse tri zarodne plasti. Tudi izvor različnih linij humanih EMC je enak kot pri mišjih. Doslej so bile namreč izolirane iz morule, poznih stopenj blastociste, posameznih blastomer in partenogenetskih zarodkov (Yu in Thomson, 2008). Poznano je, da lahko partenogenetski zarodki nastanejo v celični kulturi z aktivacijo oocitov ob prisotnosti citohalazina, ki prepreči izrivanje sekundarnega polarnega telesa. Tako lahko dobimo diploidne EMC z enakim genetskim zapisom, kot ga ima darovalka oocita. Ali bi se takšne EMC lahko razvile v povsem normalne in funkcionalne celice, še ni povsem jasno, saj so bile odkrite nekatere nepravilnosti, ki bi lahko to preprečevale (Bang in Carpenter, 2009).

Tako kot pri EC celicah tudi v primeru EMC velja, da je izražanje površinskih označevalcev drugačno pri miših kot pri človeku. Za oboje pa je značilno, da izražajo osnovne transkripcijske faktorje Oct-4, Sox-2 in Nanog, ki označujejo pluripotentno stanje (Bang in Carpenter, 2009). Vendar se mehanizmi vzdrževanja pluripotentnosti med

humanimi in mišjimi EMC bistveno razlikujejo. V brezserumski kulturi se nediferencirano stanje mišjih EMC doseže s kombinacijo levkemičnega inhibitornega faktorja (LIF) in proteina kostne morfogeneze (BMP, angl. bone morphogenic protein). Prvi aktivira prenos signala in aktivacijo transkripcije preko Janus kinaze (JAK/STAT3, angl. Janus kinase signal transducer and activator of transcription), ki zagotavlja samoobnavljanje EMC, drugi pa povzroči izražanje inhibitorjev diferenciacije preko signalne poti Smad ter tako prepreči diferenciacijo EMC. Na humane EMC LIF nima vpliva, BMP pa povzroči diferenciacijo celic. Za vzdrževanje pluripotentnosti ima pri humanih EMC pomembno vlogo bazični rastni dejavnik fibroblastov (bFGF, angl. basic fibroblast growth factor), ki v povezavi s signalnimi potmi transformirajočega rastnega dejavnika beta (TGF β , angl. transforming growth factor beta), aktivina in nodala, inhibira delovanje BMP ter omogoči samoobnavljanje celic (Yu in Thomson, 2008). Možno je tudi, da so populacije celic, iz katerih izvirajo mišje in humane EMC, na različnih stopnjah v embrionalnem razvoju in zato nimajo enakih mehanizmov za ohranjanje pluripotentnosti. Razlike med humanimi in mišjimi EMC bi lahko bile posledica različnega embrionalnega razvoja vrst ali pa so populacije celic, iz katerih izhajajo, na različnih stopnjah v embrionalnem razvoju (Rossant, 2008).

2.1.2.3 Matične celice epiblasta

Pluripotentne matične celice so bile izolirane tudi iz poznejših stopenj embrionalnega razvoja, ko se ICM že razdeli na hipoblast, iz katerega se razvije rumenjaka vrečka, in epiblast, iz katerega nastane zarodek. Iz mišjega epiblasta so bile izolirane matične celice (EpiMC, angl. epiblast stem cells), ki jih lahko uspešno gojimo v kulturi in se lahko diferencirajo v vse tri zarodne plasti (Brons in sod. 2007; Tesar in sod. 2007). EpiMC izražajo pluripotentne označevalce Oct-4, Sox-2 in Nanog ter tvorijo teratome. Ob vnosu v mišjo blastocisto ne prispevajo k razvoju himer. Za razliko od mišjih EMC se ne odzivajo na LIF, temveč potrebujejo za ohranjanje pluripotentnosti FGF in aktivin, podobno kot humane EMC. Prav tako je njihov profil izražanja in mreža transkripcijskih faktorjev bližje humanim kot mišjim EMC. Zaradi tega bi lahko sklepali, da humane EMC, če jih primerjamo s celicami *in vivo*, pravzaprav bolj odražajo stanje celic epiblasta kot pa celic ICM (Rossant, 2008).

Izhajajoč iz razlik med mišjim in humanimi EMC in dejstev: (i) da do sedaj pri nobenem sesalcu, razen pri miših, ni bila dokazana neposredna izolacija povsem pluripotentnih celic iz blastociste, (ii) da pri embrionalnem razvoju miši LIF signalna pot ni potrebna za normalen razvoj epiblasta, temveč igra pomembno vlogo pri ohranjanju epiblasta pri zakasnenih implantacijah zarodka, in (iii) da zato pri organizmih, ki nimajo mehanizmov zakasnitve implantacije, ohranitev celic v stanju, kot so mišje EMC, preko LIF signalne poti ni mogoča, Rossant sklepa, da lastnosti EMC, kot jih poznamo pri miših morda niso skupne vsem sesalcem. Mehanizmi ohranjanja pluripotentnosti preko FGF in aktivina, kot jih imajo humane EMC in mišje EpiMC, bi lahko predstavljali ohranjene poti razvoja zarodnih plasti pri vseh vretenčarjih. V tem primeru bi bile EpiMC oblika pluripotentnih celic, značilna za mnoge vrste. Ta hipoteza je pomembna, saj lahko izvor pluripotentnih celic bistveno vpliva na primerljivost raziskovalnih protokolov med različnimi vrstami. Metode diferenciacije, razvite na mišjih EMC, tako ne moremo enostavno prenesti na humane EMC (Rossant, 2008). Prav tako obstaja možnost, da izolacija humanih EMC s

FGF in aktivinom favorizira proliferacijo celic, podobnih mišjim EpiMC, in na ta način zamaskira celice, podobne mišjim EMC (Jaenisch in Young, 2008).

2.1.2.4 Pluripotentne linije iz spolnih celic

Pluripotentne celice iz linije spolnih celic so bile prvič izolirane leta 1992 iz primordialnih germinalnih celic (PGC) (Matsui in sod. 1992; Resnick in sod. 1992). PGC izvirajo iz epiblasta in v embrionalnem razvoju najprej migrirajo do izvenembrionalnega mezoderma ter nato preko endoderma zadnjega črevesa do spolnih grebenov, kjer se diferencirajo v zrele spolne celice. PGC same niso pluripotentne, saj če jih gojimo *ex vivo*, nimajo zmožnosti samoobnavljanja in se diferencirajo. Ob vnosu v blastocisto tudi ne prispevajo k nastanku himere, poleg tega se ob prenosu njihovega jedra v oocit ne more razviti embrio. Na zgodnji stopnji njihovega razvoja se jim namreč spremeni epigenetski profil somatsko vtisnjenih genov, kar jim onemogoča nenadzorovane delitve, partenogenezo in tvorbo teratomov (Ratajczak in sod., 2008b). Za nastanek embrionalnih germinalnih (EG) celic je potrebno gojenje PGC na hranilni plasti ob dodatku dejavnika matičnih celic (SCF, angl. stem cell factor), LIF in FGF. Tako pridobljene mišje EG celice imajo enako morfologijo kot EMC ter izražajo tudi enake označevalce pluripotentnosti, kot sta SSEA-1 in Oct-4. Ob vnosu v blastocisto prispevajo k razvoju vseh celičnih tipov, vključno s spolnimi celicami. Za razliko od EMC pa odvisno od stanja PGC, iz katerih izvirajo, ohranijo nekatere značilnosti PGC, kot so demetilacija na ravni celotnega genoma, izbris genomskega vtisnjenja in ponovna aktivacija kromosoma X (Yu in Thomson, 2008).

Leta 1998 so bile iz PGC izolirane tudi prve humane EG celice (Shamblott in sod., 1998), vendar imajo omejen proliferacijski potencial. V prvih pasażah se lahko diferencirajo v vse tri zarodne plasti *in vitro*, vendar doslej še ni bilo pokazano, da bi lahko tvorile teratome. V primerjavi s humanimi EMC zahtevajo drugačne pogoje gojenja, imajo spremenjeno morfologijo in izražajo marker SSEA-1, ki se sicer izraža v zgodnjih spolnih celicah (Yu in Thomson, 2008).

Pred kratkim so izolirali pluripotentne celice iz neonatalnih in odraslih mišjih testisov (Kanatsu-Shinohara in sod. 2004; Guan in sod. 2006). Imenovali so jih multipotentne matične celice iz germinalne linije (mGMC, angl. multipotent germ line stem cells) in imajo podobno morfologijo in izražajo enake označevalce kot mišje EMC, diferencirajo se v vse zarodne plasti *in vitro*, tvorijo teratome in ob vnosu v blastocisto tvorijo vse celične tipe, vključno s spolnimi celicami. Imajo pa drugačen epigenetski profil od mišjih EMC in matičnih celic germinalne linije (Yu in Thomson, 2008). Ni še znano, ali predstavljajo endogeno populacijo matičnih celic v testisih, ali pa so zgolj posledica reprogramiranja z gojenjem *in vitro* (Bang in Carpenter, 2009). Prav tako je bila iz odraslih mišjih spermatogonijskih predniških celic izpeljana populacija multipotentnih odraslih spermatogonijskih matičnih celic (MASC, angl. multipotent adult spermatogonial stem cell), ki imajo drugačen ekspresijski profil kot mišje EMC, a se podobno kot mišje EpiMC lahko diferencirajo v vse tri zarodne plasti *in vitro*, lahko tvorijo teratome, ne prispevajo pa k razvoju himer (Seandel in sod., 2007).

2.1.2.5 Reprogramirane pluripotentne matične celice

Pluripotentnost lahko dosežemo tudi z reprogramiranjem somatskih celic odraslega osebk, tako da z izbrisom epigenetskega profila celice dosežemo povečanje potentnosti. Celice lahko reprogramiramo z gojenjem celic v kulturi, preko fuzije s pluripotentimi celicami, s

prenosom jedra somatske celice (SCNT, angl. somatic cell nuclear transfer) ali pa preko virusne transdukcije transkripcijskih faktorjev. Z metodami reprogramiranja lahko ustvarimo pluripotentne celice, ki imajo enak genetski zapis kot darovalec (Bang in Carpenter, 2009).

Prenos jedra somatske celice

S kloniranjem ovce Dolly (Wilmut in sod., 1997) je bilo v nasprotju s tedanjim prepričanjem dokazano, da se lahko epigenetski profil diferencirane somatske celice sesalcev spremeni v embrionalno stanje in razvije v nov organizem. Pri postopku prenosa jedra somatske celice iz oocita odstranimo jedro in ga nadomestimo z jedrom somatske celice. Vsebinska citoplazma oocita reprogramira jedro somatske celice v totipotentno stanje, kar omogoči razvoj začetnih faz zarodka. Ta se lahko nato uporabi za izolacijo EMC ter za namene razmnoževalnega ali terapevtskega kloniranja (Bang in Carpenter, 2009). Čeprav so bile z metodo prenosa somatske celice že ustvarjene linije EMC primatov, je postopek premalo učinkovit, da bi bil uporaben za terapevtske namene pri človeku (Yu in Thomson, 2008).

Fuzija s pluripotentnimi celicami

Fuzija somatskih celic s pluripotentnimi celičnimi linijami uspešno reprogramira somatsko jedro do nediferenciranega stanja. Hibridi z mišjimi EMC, EG in EC celicami izražajo podobne značilnosti kot pluripotentne celice. Enako velja tudi za hibride s humanimi pluripotentnimi linijami. Uspešnost reprogramiranja somatskega jedra je bila potrjena z aktivacijo somatskega kromosoma X. Vendar so tako pridobljene celice tetraploidne, kar onemogoča njihovo uporabo v terapevtske namene (Jaenisch in Young, 2008).

Reprogramiranje s pogoji gojenja

Z gojenjem *in vitro* celice izpostavimo drugačnim selekcijskim pogojem kot vladajo v organizmu, tako njihovo končno stanje v kulturi ni enako stanju *in vivo*. Z gojenjem večinoma selekcioniramo proliferativno sposobnost celic, zato nastanejo epigenetske in biološke razlike v primerjavi z izvirno populacijo. Kot je bilo že opisano zgoraj, lahko s pogoji gojenja iz usmerjenih PGC ali spermatogonijev preko gojenja z različnimi faktorji dobimo pluripotentne linije mGMC in MASC (Jaenisch in Young, 2008).

Inducirane pluripotentne matične celice

Faktorji, ki reprogramirajo celice do pluripotentnega stanja, so bili pri uporabi zgoraj opisanih treh metod neznani. Dokler nista dve skupini opravili virusne transdukcije s kombinacijami različnih genov, ki so kazali pomembno vlogo pri ohranjanju pluripotentnosti, in določili nujno potrebne transkripcijske faktorje za reprogramiranje somatskih celic. Prva skupina je z virusno transdukcijo genov *oct-4*, *sox-2*, *c-myc* in *klf4* v mišje fibroblaste embrionalnega in odraslega izvora uspela inducirati pluripotentno stanje celic (Takahashi in Yamanaka, 2006). Po nekaj modifikacijah pri postopku selekcije reprogramiranih celic jim je uspelo vzpostaviti linijo, ki je imela vse značilnosti mišjih EMC, vključno z razvojem spolnih celic pri tvorbi himer. Vseeno pa so himerne miši z vnesenimi induciranimi pluripotentnimi matičnimi celicami (iPS, angl. induced pluripotent stem cell) tvorile tumorje pogostejše kot v primeru vnosa EMC (Yu in Thomson, 2008). Na podoben način jim je uspelo reprogramirati tudi humane fibroblaste. Druga skupina je z

virusno transdukcijo genov *oct4*, *sox2*, *nanog* in *lin28* prav tako uspela reprogramirati humane fibroblaste (Yu in sod., 2007). Obe liniji reprogramiranih fibroblastov imata podobne značilnosti kot humane EMC. Učinkovitost samega reprogramiranja je sicer zelo majhna (< 0,1%), kar pa ne vpliva na ponovljivost in uporabnost metode in torej ne predstavlja bistvene težave, razen če bi s pogoji reprogramiranja selekcionirali nenormalne genetske in epigenetske dogodke. Za razvoj terapevtske uporabe iPS celic je pomemben razvoj metod, pri katerih bi genetski material celice ostal nespremenjen (Yu in Thomson, 2008).

2.1.3 Domnevno pluripotentne matične celice

Kot je predstavljeno v prejšnji točki, lahko samo celice, iz katerih se lahko razvijejo gamete ali pa so že same spolne celice, neposredno tvorijo linije pluripotentnih matičnih celic (Rossant, 2008). V zadnjem času pa je bilo v odraslih ali neonatalnih tkivih sesalcev odkritih veliko različnih populacij celic, ki izražajo označevalce, značilne za pluripotentne matične celice. Identificirane so bile v kostnem mozgu, periferni krvi, popkovnični krvi, pljučih, srcu, trebušni slinavki, pokožnici, očesni mrežnici, površini jajčnika, testisih, amnijski tekočini, placenti, lasnih mešičkih, ledvicah, zobni pulpi, jetrih, epitelu mlečne žleze, ščitnici in možganih (Ratajczak in sod., 2007a; De-Miguel in sod., 2009; Lengner in sod., 2007). Nekatere od njih se lahko diferencirajo tudi v več kot eno zarodno plast. Ker izražajo podobne lastnosti kot EMC, so bile označene kot pluripotentne matične celice. Vendar pa nobene niso bile sposobne ob vnosu v blastocisto prispevati k razvoju himere, tako da njihov pluripotentni potencial ni bil potrjen *in vivo*. (Možno je, da takšne celice, navkljub izkazanemu pluripotentnemu potencialu *in vitro*, ne morejo prispevati k razvoju zarodka *in vivo*: ker potrebujejo ustrezno aktivacijo; ker niso odzivne na faktorje v blastocisti; ker se delijo počasneje in jih EMC prerastejo; ali ker imajo podobno kot PGC spremenjen profil vtisnjenih genov, ki je ključen za pravičen embrionalni razvoj (Ratajczak in sod., 2008b).

Pri definiranju pluripotentnosti humanih matičnih celic se zaradi etičnih zadržkov kot najstrožji kriterij ne more upoštevati prispevek celic k razvoju zarodka ob vnosu v blastocisto. Na voljo so le manj strogi kriteriji, kot sta tvorba teratomov in diferenciacije *in vitro*. Pogosto tudi ni smiselno zadostiti vsem kriterijem in porabiti veliko časa ter sredstev za definiranje nekih celic kot pluripotentnih. V ospredju raziskav na človeških matičnih celicah je namreč njihova uporaba v terapevtske namene. Glavni namen je pokazati, da lahko z določeno terapijo izboljšamo stanje pacienta, pri čemer ocenjujemo funkcionalnost določene populacije celic (Smith in sod., 2009). Te raziskave so izpostavljene večjim pritiskom tako javnosti kot kapitala. In v preteklosti je bilo kar nekaj senzacionalnih objav, katerih rezultati so bili kasneje postavljeni pod vprašaj. Še posebej na tako aktualnem področju, kot so raziskave na matičnih celicah, hitro pride do napačne interpretacije rezultatov oziroma se jih preceni (Berg in Goodell, 2007). Zaradi tega lahko pride do kontroverznih primerov, med katere zagotovo spadata izražanje pluripotentnega označevalca Oct-4 in pa koncept plastičnosti oziroma transdiferenciacije matičnih celic odraslega, opisana v naslednjih dveh odstavkih.

Zaradi vloge, ki jo ima transkripcijski faktor Oct-4 pri vzdrževanju pluripotentnosti, je veliko raziskovalcev uporabljalo njegovo izražanje kot enega ključnih dokazov za obstoj pluripotentnosti celic. Gen za *oct-4* se izraža v najmanj treh spojitvenih oblikah: Oct-4A, Oct-4B in Oct-4B1, od katerih je le za Oct-4A znana vloga pri ohranjanju pluripotentnosti.

Poleg tega obstajajo za Oct-4 v genomu tudi psevdogeni, ki so nastali z retrotranspozicijo mRNA v DNA in tako vsebujejo zgolj zapis za eksone. Običajno lahko z začetnimi oligonukleotidi, ki segajo čez dva sosednja eksone, pri verižni reakciji s polimerazo (PCR; angl. polimerase chain reaction) razlikujemo med zapisom gena v DNA, ki vsebuje introne, in zapisom v cDNA, kjer so introni izrezani. Za gen *oct-4* zaradi nekaterih močno homolognih psevdogenov, ki so nastali z retrotranspozicijo, to ni mogoče, zato je potrebno genomsko DNA razgraditi z DNazo (Wang in Dai, 2010). Za ugotavljanje izražanja *oct-4A* z metodo reverzne transkripcije in PCR (RT-PCR, angl. reverse transcription polimerase chain reaction) je torej potrebno upoštevati zgoraj naštetе vidike, kar v nekaterih primerih ni bilo storjeno. Zato so se pojavili dvomi o izsledkih takih študij (Liedtke in sod., 2007). Tudi vloga Oct-4 pri ohranjanju samoobnavljanja matičnih celic v odraslih tkivih sproža polemike. V poskusu, kjer so pri gensko spremenjenih miših onemogočili izražanje Oct-4, v odraslih tkivih ni bilo ugotovljenih nobenih sprememb pri funkcionalnosti ali regeneraciji tkiv (Lengner in sod., 2007). Študija sicer ne podaja dokončnih dokazov o vlogi Oct-4 pri procesih regeneracije, saj zaradi uporabljenega pristopa niso možni enoznačni zaključki, je pa morda indikator, da je na tem področju potrebno opraviti podrobnejše raziskave (Berg in Goodell, 2007).

V kostnem mozgu se nahajajo krvotvorne matične celice (KMC), iz katerih nastanejo celične linije, prisotne v krvi. V zadnjem obdobju so nekatere študije dokazovale, da lahko KMC prispevajo k regeneraciji različnih tkiv in organov. Podlaga za to je bila hipoteza o plastičnosti KMC, ki bi se lahko trans-diferencirale v celice drugih organov in tkiv. Tako bi lahko kostni mozeg, periferna in popkovnična kri postali univerzalen vir matičnih celic za regeneracijo tkiv in organov. K temu so prispevale objave o prispevku KMC k uspešni regeneraciji srca, možgan, hrbtnjače in jeter (Ratajczak in sod., 2008a). Vendar se je izkazalo, da so nekatere študije imele napačno zasnovane poizkuse ali pa so bili rezultati napačno interpretirani (Jaenisch in Young, 2008). Nadaljnji eksperimenti z očiščenimi populacijami KMC so pokazali neučinkovitost pri regeneraciji srca ali možgan. Zaradi tega je znanstvena skupnost zavzela različna stališča glede pojava plastičnosti. Za obrazložitev plastičnosti KMC so bile predstavljene različne možnosti. KMC se lahko preko fuzije združijo s celicami v poškodovanem tkivu in tako izražajo označevalce darovalca in prejemnika, kar lahko vodi do lažno pozitivnih rezultatov. Rezultati o plastičnosti bi lahko bili posledica začasne spremembe fenotipa celic darovalca zaradi prenosa receptorjev, proteinov in mRNA preko mikroveziklov med KMC in poškodovanimi celicami. Plastičnost bi bila lahko posledica faktorjev, prisotnih v bližini poškodovanega tkiva, ki bi lahko povzročili epigenetske spremembe in vplivali na pluripotentnost KMC. Prav tako bi lahko KMC izločale faktorje, ki bi spodbudili regeneracijo tkiv. Ena izmed možnosti pa je tudi, da je populacija očiščenih KMC v resnici nehomogena in torej vsebuje še druge ne-krvotvorne matične celice (Ratajczak in sod., 2008a).

V odraslih in neonatalnih tkivih lahko navkljub pomislekom, ki spremljajo raziskovanje matičnih celic odraslega, verjamemo, da so prisotne populacije celic z velikim diferenciacijskim potencialom. Zaradi pomanjkanja dokazov o njihovi popolni pluripotentnosti jih lahko označimo kot domnevno pluripotentne.

2.1.3.1 Mezenhimske matične celice

Mezenhimske matične celice (MMC) oziroma multipotentne stromalne celice (v angl. oboje MSC: mesenchymal stem cells, multipotent stromal cells) so bile prvič izolirane iz

kostnega mozga preko selekcije adherentne frakcije celic, ki so kazale osteogeni potencial. Kasneje je bilo pokazano, da so sposobne diferenciacije tudi v druga vezivna tkiva. Tako so običajno definirane kot adherentne, fibroblastom podobne celice, ki se lahko *in vitro* diferencirajo v osteoblaste, adipocite in hondroците. Poleg v kostnem mozgu se nahajajo v vezivnih tkivih skoraj vseh organov (Phinney in Prockop, 2007). Poleg tega je bilo v zadnjem času bilo v populaciji mišjih in humanih MMC preko različnih načinov gojenja brez dodatka seruma ugotovljeno izražanje pluripotentnih označevalcev Oct-4, SSEA in Nanog, ki naj bi bilo posledica prisotnosti nediferencirane primitivne populacije MMC. Ta se lahko diferencira *in vitro* v celice vseh treh zarodnih plasti (Battula in sod., 2007; Pochampally in sod., 2004).

2.1.3.2 Multipotentne prednice odraslega

Multipotentne prednice odraslega (MAPC, angl. multipotent adult progenitor cells) so bile izolirane iz različnih mišjih in podganjih tkiv ter tudi iz humanega kostnega mozga. Pri izolaciji iz kostnega mozga se izolira enojedrne celice in goji v posebej prilagojenih gojiščih podobnim tistim za EMC. Po 21 dneh gojenja se odstrani vso levkocitno in eritroidno populacijo celic. Uspešnost izolacije MAPC se od vzorca do vzorca razlikuje, pri čemer se je za bolj učinkovito izkazala pri mlajših osebkih. Gojenje MAPC je močno odvisno od koncentracije kisika in uporabljene sarže seruma dodanega k gojišču. Zaradi strogih zahtev pri gojenju celic je onemogočena kakršnakoli avtomatizacija postopkov. Tako humane kot podganje MAPC ne kažejo razlik v kariotipu, le te pa se pogosto pojavijo pri mišjih MAPC. Za MAPC je značilna telomerazna aktivnost in izražanje pluripotentnih označevalcev kot so Oct-4, SSEA-1, Nanog, Rex1. *In vitro* se lahko diferencirajo v celice značilne za vse tri zarodne plasti. Ob vnosu v SCID miši MAPC ne tvorijo teratomov temveč se diferencirajo v različne linije celic ter se vključijo v tkiva (Jahagirdar in Verfaillie, 2005). MAPC so bile sicer edine domnevno pluripotentne matične celice iz odraslih tkiv, za katere je bilo pokazano, da ob vnosu v blastocisto prispevajo k razvoju večine celic (Jiang in sod., 2002). Vendar pa ta rezultat ni bil potrjen s strani neodvisnih laboratorijev (Jaenisch in Young, 2008).

2.1.3.3 Celice MIAMI

Celice MIAMI (angl. marrow isolated multilineage inducible cells) so bile izolirane iz humanega kostnega mozga. Vzorci kostnega mozga oseb, starih od 3 do 72 let, so bili gojeni v pogojih, ki naj bi čim boljje predstavljali okolje v kostnem mozgu. Po 14 dneh gojenja celotne frakcije kostnega mozga na fibronektinu in ob nizkih koncentracijah kisika so bile izolirane kolonije celic. Te so pri nadaljnjem gojenju izkazale velik proliferativni potencial. Dosegle so najmanj 50 podvojitev populacije, pri čemer ni bilo opaznih nobenih sprememb v diferencijskem potencialu in morfologiji celic. Poleg ostalih označevalcev in telomeraze izražajo tudi transkripcijska faktorja Oct-4 in Rex1, ki sta značilna za pluripotentne matične celice. Pri diferenciaciji *in vitro* so sposobne tvoriti celice iz vseh treh zarodnih plasti. Ob vnosu v SCID miš ne tvorijo tumorjev (D'Ippolito in sod., 2004).

2.1.3.4 Celice hMASC

Celice hMASC (angl. human multipotent adult stem cells) so bile izolirane iz humanih jeter, srca in kostnega mozga. Klonalno namnožene hMASC izražajo transkripcijske faktorje Oct-4, Nanog in REX1, ki so značilni za pluripotentne matične celice. Kažejo tudi

telomerazno aktivnost in so sposobne diferenciacije v celice iz vseh treh zarodnih plasti. Njihov kariotip ni spremenjen in ob vnosu v SCID miš ne tvorijo tumorjev. Z analizo preko mikročipov so ugotovili, da imajo hMASC iz različnih tkiv podoben profil izražanja in torej predstavljajo skupno populacijo celic (Beltrami in sod., 2007).

2.1.3.5 Embrionalne matične celice odraslega

V površinskem epiteliju jajčnika se nahajajo embrionalne matične celice odraslega (ESC-A, angl. embryonic-like stem cell of the adult), ki izražajo označevalce pluripotentnih matičnih celic Oct-4, Sox-2, Nanog in SSEA-4. Pri gojenju teh celic se razvijejo velike celice, ki tvorijo nekatere strukture, značilne za jajčne celice, in hkrati tudi izražajo označevalce jajčnih celic. Poleg jajčnim celicam podobnih celic nastajajo *in vitro* tudi strukture, podobne blastocistam, kar kaže, da pride do partenogenetskega razvoja zarodka (Virant-Klun in sod. 2008, 2009).

2.1.3.6 Embrionalnim matičnim celicam podobne celice iz popkovnične krvi

Izdelan je bil tudi postopek, kako iz popkovnične krvi pridobiti embrionalnim matičnim celicam podobne celice. Najprej so z imunomagnetno selekcijo odstranili granulocite, eritrocite in predniške krvotvorne celice eritroidne ter limfoidne linije. S posebnimi postopki gojenja so preostale celice namnožili in na koncu dobili populacijo celic, ki izražajo označevalce značilne za embrionalne matične celice: SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 in Oct-4, ne pa tudi SSEA-1, ki v humanih EMC kaže na izgubljanje diferenciacijskega potenciala (McGuckin in sod., 2005). Takšne celice so sposobne diferenciacije v celice možgan, jeter, endotelija, krvi in trebušne slinavke, ter tako posedujejo pluripotenten diferenciacijski potencial (Leeb in sod., 2010).

2.1.3.7 Celice VSEL

Za skoraj vse zgoraj naštetih matičnih celic iz neonatalnih in odraslih tkiv je skupno, da so z različnimi metodami gojenja uspeli pridobiti domnevno pluripotentne celice. Ni pa jasno, ali so te celice zgolj rezultat reprogramiranja celic s pogoji gojenja ali pa so posledica prisotnosti pluripotentnih matičnih celic *in vivo*. Poleg pri že omenjenih celicah iz humanega epitelija jajčnika so tudi v kostnem mozgu miši uspeli izolirati celice, ki izražajo pluripotentne označevalce, in tako neposredno dokazali obstoj zelo majhnih embrionalnim matičnim celicam podobnih celic (VSEL, angl. very small embryonic-like stem cell). Ta redka populacija matičnih celic (0,01% od vseh enojedrnih celic) je bila izolirana iz kostnega mozga z lizo eritrocitov in s pomočjo ločevalnika fluorescenčno označenih celic (FACS, angl. fluorescence activated cell sorter) na podlagi izražanja površinskega antigena Sca-1 in odsotnosti površinskih označevalcev, značilnih za linijsko usmerjene celice (Lin), ter površinskega antigena CD45. Z imunocitokemijskimi metodami in RT-PCR je bilo dokazano izražanje telomeraze in pluripotentnih označevalcev SSEA-1, Oct-4, Nanog in Rex-1. Ne izražajo antigenov MHC-I in HLA-DR ter so negativne za površinske označevalce CD90, CD105, CD29. Mikroskopska analiza z elektronskim mikroskopom je pokazala, da so te celice velike od 2 do 4 μm , imajo veliko jedro, obdano z majhnim plaščem citoplazme, ter imajo odprto strukturo kromatina, kar je značilno tudi za EMC. Prisotnost VSEL je bila dokazana tudi v timusu, srcu, trebušni slinavki, jetrih, možganih, ledvicah in pljučih (Ratajczak in sod., 2007a; Kucia in sod., 2007b).

VSEL lahko, če jih gojimo na hranilni podlagi iz mišjih mioblastov C2C12, tvorijo skupke celic, ki so podobni embrioidnim telescem, pridobljenih iz EMC. Te celice še vedno izražajo enake označevalce kot sveže izolirane VSEL. Skupki, nastali iz VSEL celic, lahko z usmerjeno diferenciacijo tvorijo celice iz vseh treh zarodnih plasti. Podobne skupke lahko tvorijo tudi celice, izoliranih iz fetalnih jeter, vranice in timusa. Zanimivo je, da samo VSEL celice, izolirane iz miši, mlajših od dveh let, tvorijo takšne skupke. VSEL celice izražajo tudi receptor CXCR4, ki je povezan s kemotakso odvisno od gradienta rastnega faktorja SDF-1, in se dobro prilepijo na podlago iz fibronektina in fibrinogena. Zaradi teh lastnosti se VSEL prilepijo na stromalne celice in lahko prispevajo k domnevni plastičnosti matičnih celic iz kostnega mozga (Ratajczak in sod., 2007a).

VSEL izražajo označevalce (fetalna oblika alkalne fosfataze, Oct-4, SSEA-1, CXCR4, Mvh, Stella, Fragilis, Nobox, Hdac6), ki so značilni za populacijo PGC. Zato bi lahko predstavljale populacijo celic v odraslih tkivih, ki izvira iz populacije PGC. Predstavljena je bila hipoteza, da se pri gastrulaciji del celic, ki izvira iz epiblasta, ne diferencira v katero izmed treh zarodnih plasti, ampak ohranijo pluripotentni potencial in predstavljajo populacijo matičnih celic, iz katere izhajajo tkivno specifične matične celice. Migracija PGC, ki izvirajo iz epiblasta, poteka preko gastrulacije najprej do izvenembrionalnega mezoderma, nato preko endoderma zadnjega črevesa in regije AGM (območje, iz katerega se razvijejo aorta, gonade in mezonefros) do spolnih grebenov, kjer se izoblikujejo spolni organi. Povezana je z izražanjem receptorja CXCR4 in njegovim ligandom SDF-1. Prav tako so podobni mehanizmi prisotni pri krvotvornih matičnih celicah, ki skozi embrionalni razvoj potujejo do različnih delov zarodka (Kucia in sod., 2006a). Hematopoeza se namreč v zarodku začne v rumenjakovi vrečki in AGM, nato se preseli v fetalna jetra, sledi selitev v vranico in nazadnje v kostni mozeg (De-Miguel in sod., 2009). Tako lahko manjša populacija celic, ki izvira iz PGC, zapusti svojo običajno pot in potuje skupaj s krvotvornimi matičnimi celicami. Zuba-Surma in sodelavci (2009) so pokazali, da se VSEL nahajajo v fetalnih jetrih v povečanem številu ravno v obdobju, ko je tam tudi največ krvotvornih matičnih celic. Število obeh se nato v jetrih zmanjša zaradi selitve v kostni mozeg. Povezava med krvotvornimi matičnimi celicami in VSEL še ni popolnoma jasna. Nekatere preliminarne raziskave so sicer pokazale da se lahko VSEL *in vitro* diferencirajo v krvotvorne matične celice, ki lahko obnovijo krvotvorno funkcijo *in vivo*. Njihov prispevek k tvorjenju krvotvornih matičnih celic zahteva nadaljnje raziskave (Zuba-Surma in sod., 2009b).

Povezava med VSEL in celicami epiblasta oziroma PGC, ki iz njega izvirajo, je bila podrobneje raziskana s primerjanjem epigenetskih profilov obeh celic. PGC se pri migraciji do spolnih grebenov spremeni metilacijski profil, ki je značilen za somatske celice in je posledica paternalno in maternalno vtisnjenih genov. To naj bi bilo povezano s preprečevanjem možnosti nenadzorovanih delitev, partenogeneze in tvorbe teratomov. Vendar lahko iz PGC z ustrezno metodo gojenja vseeno pridobimo pluripotentne EG celice. Podobno bi lahko veljalo tudi za VSEL, za katere še ni bilo pokazano, da bi lahko prispevale k razvoju zarodka. Tvorba skupkov celic, ki nastanejo pri gojenju VSEL in imajo velik diferenciacijski potencial, bi lahko nakazovala podoben mehanizem reprogramiranja celic. Novejše študije, pri katerih so bili upoštevani pomisleki glede določanja izražanja transkripcijskega faktorja Oct-4, so potrdile njegovo izražanje. Dodatno so ugotovile podoben metilacijski profil promotorja za gena *oct-4* in *nanog*, kot ga imajo EMC. Nadaljnja primerjava metilacijskega profila med PGC in VSEL je pokazala, da

imajo nekaj genov podobno vtisnjenih. A so bile hkrati ugotovljene tudi razlike pri metilacijskih profilih vtisnjenih genov, ki so neposredno povezani z regulacijo proliferacije. Primerjave VSEL celic iz kostnega mozga odraslih miši in VSEL celic iz mišjih fetalnih jeter so pokazale, da slednje močneje izražajo pluripotentne označevalce in imajo metilacijski profil vtisnjenih genov bolj podoben PGC. Tako imajo VSEL celice iz fetalnih jeter večji proliferacijski in diferenciacijski potencial. Z vplivanjem na mehanizme metilacije v VSEL celicah bi lahko aktivirali njihovo proliferacijsko aktivnost, kar bi omogočilo uporabo njihovega diferenciacijskega potenciala (Shin in sod., 2009; 2010).

VSEL celice so bile izolirane tudi iz humane popkovnične (CB-VSEL, angl. cord blood-derived VSEL) in periferne krvi. Postopek izolacije je podoben kot pri mišjih VSEL, tako da z izolacijo MNC preko lize eritrocitov ter uporabo FACS na koncu dobimo populacijo celic, ki je negativna za označevalce linijsko usmerjenih celic (Lin: CD19, CD2, CD3, CD14, CD66b, CD24, CD16, CD56, CD235a,) in za skupen označevalec vseh levkocitov (CD45) ter pozitivna za CD133 ali CD34 ali CXCR4 (tudi CD184). Tudi humane CB-VSEL so majhne celice velikosti od 3 do 5 μm , imajo visoko razmerje med površino jedra in površino citoplazme, imajo odprto strukturo kromatina, izražajo Oct-4 in Nanog, transkripcijska faktorja, značilna za pluripotentne matične celice, ter tudi površinski označevalec SSEA-4 (Kucia in sod., 2007a). Biološka vloga VSEL pri regeneraciji tkiv je bila preiskovana v primerih srčnega infarkta. Pri bolnikih z akutnim srčnim infarktom je bila ugotovljena povišana vsebnost VSEL v periferni krvi. Najvišja je bila 24 ur po infarktu in je korelirala s koncentracijo SDF-1 v krvi. Izolirane celice so izražale enake pluripotentne označevalce kot pri popkovnični krvi, velike pa so bile okoli 7 μm (Wojakowski in sod., 2009).

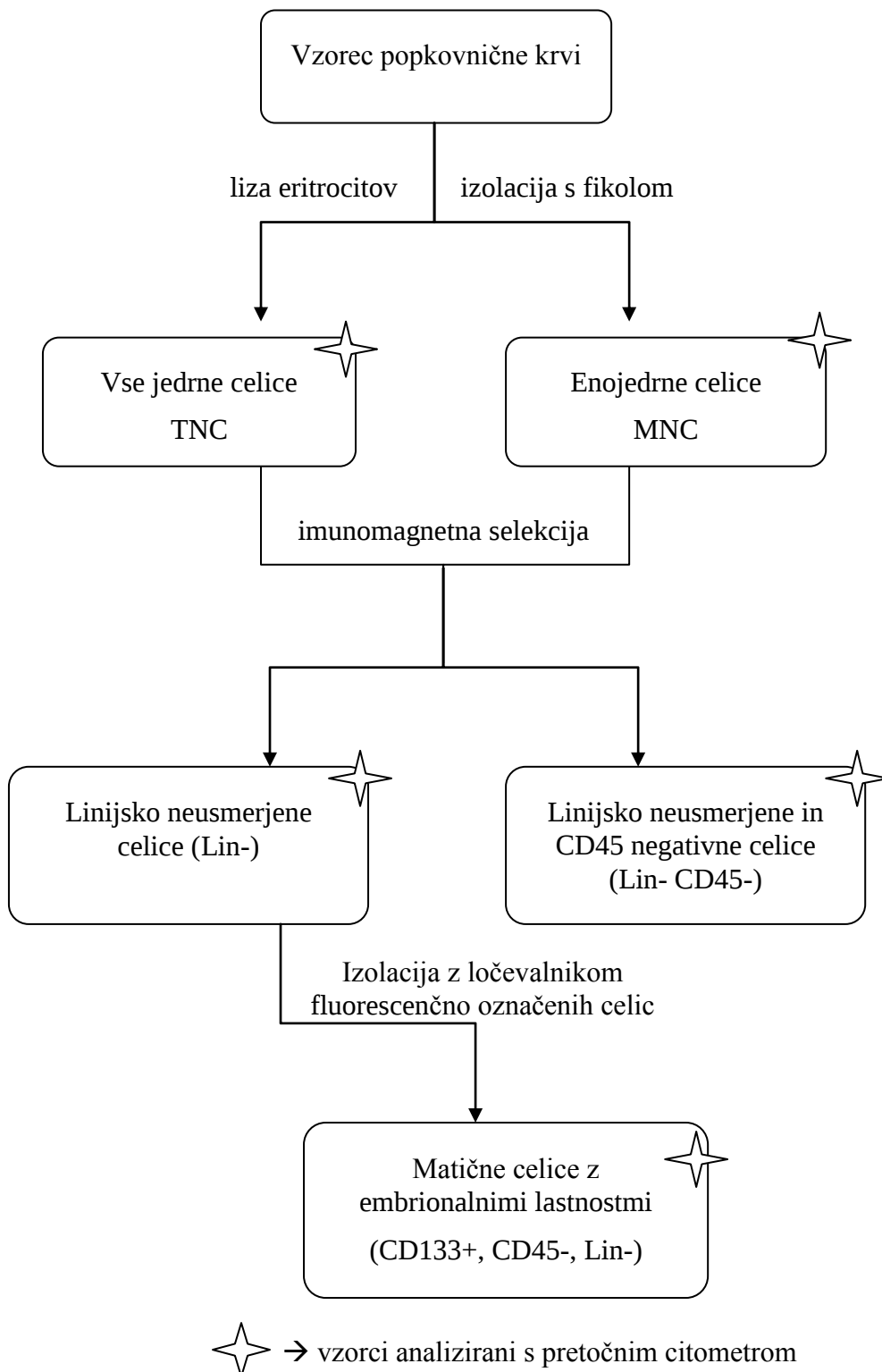
Najbolj primitivna populacija med CB-VSEL so CD133+, CD45- in Lin-, saj so najmanjše, imajo največje razmerje med površino jedra in površino citoplazme ter tudi najbolj izražajo pluripotentne označevalce. Te so hkrati v popkovnični krvi tudi najbolj redke in predstavljajo okoli 0,012% vseh celic z jedrom. Od teh so tiste, ki poleg CD133 izražajo tudi površinski označevalec embrionalnih matičnih celic SSEA-4, še bolj redke (0,0016% TNC) in kažejo še bolj primitivne značilnosti (Zuba-Surma in sod., 2010). Iz 50 do 100 ml popkovnične krvi je možno izolirati od 10 do 20 tisoč VSEL celic (Zuba-Surma in Ratajczak, 2010).

Preglednica 2: Fenotip nekaterih domnevno pluripotentnih matičnih celic (Zuba-Surma in sod., 2009a).

Domnevno pluripotentne matične celice	Fenotip	
	Pozitivni označevalci	Negativni označevalci
Mezenhimske matične celice (MMC)	CD105, CD73, CD90, Najbolj primitivne: CD184, CD133, CD34?	CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, HLA-DR
Multipotentne prednice odraslega (MAPC)	SSEA-1, CD13, Flk-1, Thy1,	CD34, CD44, CD45, CD177, MHC I, MHCII
Celice MIAMI	CD29, CD36, CD81, CD122, CD164, c-met, BMPR1B, NTRK3,	CD34-, CD36-, CD45-, CD177-
Celice hMASC	CD13, CD49b, CD90, CD73, CD44, CD29, CD49a, CD105, MHC I,	HLA-DR, CD14, CD34, CD45, CD38, CD133, CD117
Celice VSEL	CD184, CD133, CD34, SSEA-1 (mišje), SSEA-4 (humane), AP, c-met, LIF-R	CD45, Lin, HLA-DR, MHC I, CD90, CD29, CD105

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 4: Shema poteka dela.

3.2 MATERIAL

Material, uporabljen pri eksperimentalnem delu, je sprti naveden v opisu metod.

3.3 METODE

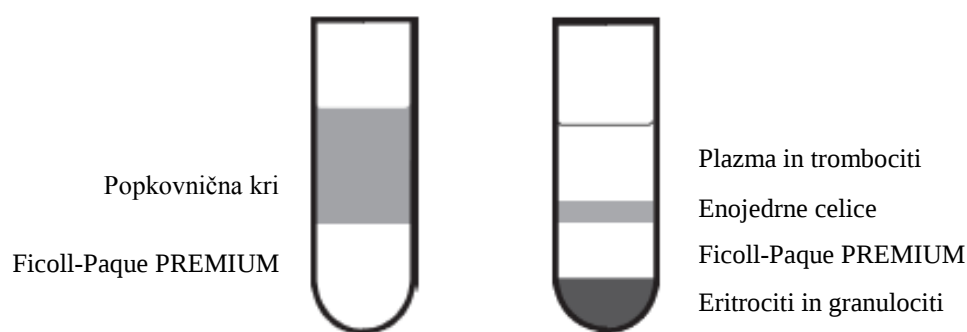
3.3.1 Pridobivanje vzorcev popkovnične krvi

Za vzorce popkovnične krvi smo uporabili vzorce iz javne banke ESPOK na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, ki niso ustrezali standardom za shranjevanje. V javni banki poteka zbiranje popkovnične krvi prostovoljnih darovalcev. Odvzem popkovnične krvi se opravi po porodu, ko je otrok že rojen, popkovnica prerezana, popkovnične žile pa prenehajo utripati. Iglo zabodejo v veno popkovnice, ko je posteljica še v maternici. Kri nato steče po cevki v sterilno vrečko za zbiranje popkovnične krvi, ki vsebuje 21 ml sredstva proti strjevanju krvi z naslednjo sestavo: natrijev citrat, natrijev fosfat, dekstroza in adenin (CPDA). Kri se nato dostavi v banko za shranjevanje popkovnične krvi, v roku 48 ur se obdelata, zamrzne ter shrani v tekočem dušiku (Darovanje popkovnične ... , 2010). Pred obdelavo se v popkovnični krvi preveri celotno število levkocitov. Za namen diplomskega dela smo uporabili vzorce, ki so vsebovali manj kot 9×10^8 levkocitov in tako niso izpolnjevali pogojev za nadaljnjo obdelavo ter dolgotrajno shranjevanje v tekočem dušiku.

S podpisom pristanka (Priloga A) so prostovoljni darovalci soglašali, da se lahko njihovi vzorci ob neizpolnjevanju pogojev za shranjevanje uporabijo v raziskovalne namene. Za delo z vzorci smo datum pridobili soglasje Komisije za medicinsko etiko številka 164/02/09.

3.3.2 Izolacija enojedrnih celic s fikolom

Enojedrne celice (MNC, angl. mononuclear cell) smo iz popkovnične krvi izolirali z gradientnim centrifugiranjem s pripravkom Ficoll-Paque™ PREMIUM (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švedska). Ficoll-Paque™ PREMIUM je vodna raztopina z gostoto 1,077 g/ml na osnovi fikola, ki je sintetični polimer šaroze in epiklorohidrina, z relativno molekularno maso 400000. Metoda gradientnega centrifugiranja temelji na razliki v gostoti MNC in drugih sestavin v krvi, tako da na koncu dobimo ločene plasti različnih tipov celic. Vzorec popkovnične krvi nanese nad plast fikola in centrifugiramo za kratek čas (Slika 5). Pri centrifugiranju celice potujejo proti meji med krvjo in sredstvom Ficoll-Paque™ PREMIUM kjer pridejo v stik s fikolom. Ta pri sobni temperaturi povzroči agregacijo eritrocitov in tako hitrejšo sedimentacijo na dno centrifugirke. V plasti neposredno nad njimi se nahajajo večinoma granulociti, katerim se ob stiku z rahlo hipertoničnim sredstvom Ficoll-Paque™ PREMIUM poveča gostota in s tem tudi hitrost sedimentacije. Limfociti in monociti se zaradi svoje majhne gostote ne morejo prebiti skozi Ficoll-Paque™ PREMIUM. Skupaj s trombociti tvorijo zgoščeno plast na meji med plazmo in sredstvom Ficoll-Paque™ PREMIUM (Slika 5). S spiranjem se nato znebimo preostanka plazme, gradientnega medija in trombocitov (GE Healthcare, 2007, 2008).



Slika 5: Izolacija enojedrnih celic s sredstvom Ficoll-Paque PREMIUM. Levo je prikazana plast popkovnične krvi nad sredstvom Ficoll-Paque PREMIUM pred centrifugiranjem in desno ločene plasti celic po centrifugiranju (GE Healthcare, 2008).

Vzorec popkovnične krvi smo najprej v razmerju 1:1 redčili s D-PBS pufrom brez Ca^{2+} in Mg^{2+} (Gibco, ZDA) ter segreli na sobno temperaturo. V 50 ml-centrifugirko smo nanegli 15 ml na sobno temperaturo segretega sredstva Ficoll-Paque PREMIUM, nanj pa 30 ml razredčene popkovnične krvi. Pri tem smo pazili, da se plasti med seboj nista premešali. Vzorce smo nato 30 minut centrifugirali na sobni temperaturi pri $400 \times g$ z minimalnim pospeševanjem in brez zaviranja. S Pasteurjevo pipeto smo odstranili plast MNC in jih prenesli v novo centrifugirko. Dodali smo pufer D-PBS do oznake 50 ml in centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$ na sobni temperaturi. Po centrifugiraju smo odstranili supernatant in MNC resuspendirali v 50 ml pufera D-PBS ter centrifugirali 10 min pri $200 \times g$ na sobni temperaturi, da smo se znebili trombocitov. Za nadaljnje delo z MNC smo odstranili supernatant in celice resuspendirali v majhnem volumnu (do 2 ml) pufera za spiranje (2 mM EDTA in 0,5% BSA v pufru D-PBS).

3.3.3 Izolacija vseh jedrnih celic z lizo eritrocitov

Pri izolaciji vseh jedrnih celic (TNC, angl. total nucleated cells) popkovnično kri izpostavimo hipotoničnemu pufru, ki povzroči lizo eritrocitov. Za izolacijo TNC smo uporabili pufer za lizo na osnovi amonijevega klorida (Lysing buffer, BD Pharm Lyse™, ZDA). 10-krat koncentriran pufer smo najprej redčili v razmerju 1:10 z destilirano vodo za izpiranje (B. Braun, Nemčija) in ga segreli na sobno temperaturo. Popkovnično kri smo prenesli v centrifugirko in ji dodali razredčen pufer v razmerju 1:10 (na primer: 5ml popkovnične krvi in 45 ml pufera za lizo). Vzorec smo dobro premešali in inkubirali 15 minut na sobni temperaturi. Nato je sledilo 10 minutno centrifugiranje na sobni temperaturi pri $300 \times g$. Supernatant smo zavržli, pelet pa resuspendirali v 50 ml pufera D-PBS in 10 minut centrifugirali na sobni temperaturi pri $300 \times g$. TNC smo še enkrat sprali s 50 ml pufera D-PBS in 10 minut centrifugirali na sobni temperaturi pri $200 \times g$. Za nadaljnje delo s TNC smo odstranili supernatant in celice resuspendirali v majhnem volumnu (do 2 ml) pufera za spiranje (2 mM EDTA in 0,5% BSA v pufru D-PBS).

Za izolacijo TNC iz celotne popkovnične krvi smo uporabili drugačen protokol. Najprej smo si pripravili pufer za lizo, ki smo ga 10-krat redčili z destilirano vodo za izpiranje ter ga segreli na sobno temperaturo. V 50-ml centrifugirke smo razporedili po 10 ml popkovnične krvi. V centrifugirke smo nato dodali po 40 ml pufera za lizo. Vzorce smo dobro premešali in inkubirali 10 minut na sobni temperaturi. Nato je sledilo 10 minutno

centrifugiranje na sobni temperaturi pri $500 \times g$. Supernatant smo zavrgli, pelet pa resuspendirali v 20 ml pufru za lizo. Vzorce smo dobro premešali in inkubirali 10 minut na 4°C . Nato je sledilo 10 minutno centrifugiranje na 4°C pri $500 \times g$. Supernatant smo zavrgli, pelet pa resuspendirali v 50 ml pufru D-PBS z 2-odstotnim fetalnim govejim serumom (FBS, angl. fetal bovine serum) in 10 minut centrifugirali na 4°C pri $500 \times g$. Supernatant smo odstranili, pelet pa resuspendirali v 50 ml pufru D-PBS z 2-odstotnim FBS. V primeru tvorbe skupkov smo celično suspenzijo spustili skozi najlonsko sito s porami velikosti $40 \mu\text{m}$ (BD Bioscience, ZDA) in 10 minut centrifugirali na 4°C pri $200 \times g$, da smo se znebili trombocitov. Za nadaljnje delo s TNC smo odstranili supernatant in celice resuspendirali v majhnem volumnu (do 4 ml) pufru za spiranje.

3.3.4 Določanje števila celic

Za določanja števila celic smo uporabljali dve metodi. V vzorcih, kjer je bilo na voljo dovolj veliko število celic, smo za določanje števila celic uporabili napravo Vi-Cell XR (Beckman Coulter, ZDA). Naprava omogoča samodejno štetje celic in oceno viabilnosti na podlagi tripanskega modrila. Za vsak tip celic je potrebno prilagoditi parametre, na podlagi katerih poteka digitalna obdelava podatkov in se določi število ter viabilnost celic. Za določanje števila celic v popkovnični krvi smo ustvarili profil (Preglednica 3), ki upošteva priporočila proizvajalca. Za štetje je potrebno pripraviti 0,5 ml vzorca, ki ga lahko predhodno redčimo. Naprava nato samodejno analizira vzorec in nam poda podatek o številu vseh celic in številu viabilnih celic.

Preglednica 3: Nastavitve profila za štetje celic v popkovnični krvi na napravi Vi-Cell.

Parameter	Vrednost
Minimalni premer celice (μm)	4
Maksimalni premer celice (μm)	10
Svetlost celice (%)	85
Ostrina celice (%)	100
Svetlost viabilnih celic (%)	65
Površina svetle točke viabilnih celic (%)	5

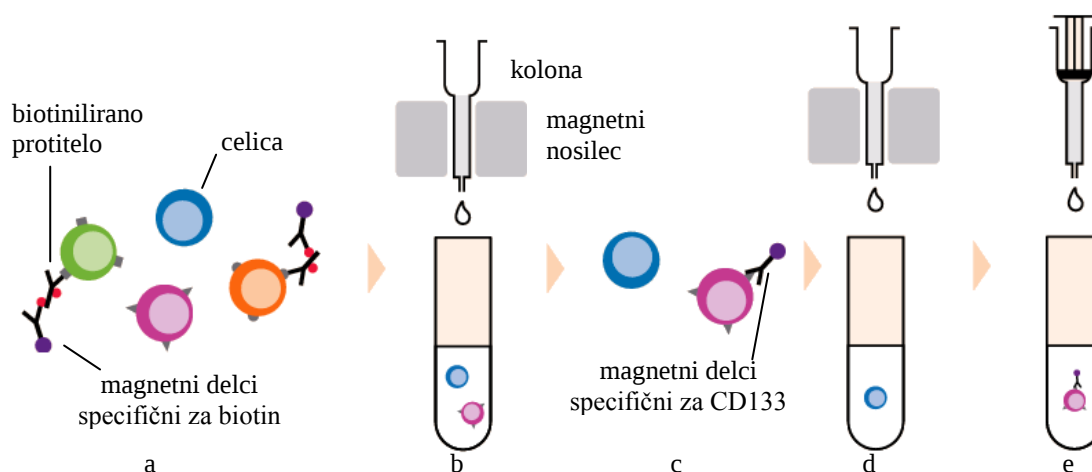
Pri vzorcih, kjer je na voljo manjše število celic, smo za določanje števila uporabili števne komore za enkratno uporabo Fast Read 102 (Immune systems, Velika Britanija). Števna komora ima vtisnjeno mrežo 10 kvadratov, pri čemer znaša volumen nad površino enega kvadrata $0,1 \mu\text{l}$. Število celic v 1 ml vzorca izračunamo tako, da število prešteti celic delimo s številom kvadratov, v katerih smo prešteli celice, ter pomnožimo z 10^4 in faktorjem redčitve. Za določanje števila celic v vzorcih smo te najprej po potrebi redčili ter nato v razmerju 1:1 zmešali s tripanskim modrilom. V števno komoro smo prenesli $10 \mu\text{l}$ dobro premešanega vzorca in celice prešteli pod mikroskopom.

3.3.5 Imunomagnetno ločevanje celic

Za imunomagnetno ločevanje celic smo uporabili Diamond CD133 isolation kit (Miltenyi Biotec, Nemčija). Postopek imunomagnetnega ločevanja celic temelji na označevanju celic s protitelesi, specifičnimi za določen antigen. Na protitelesa so lahko neposredno ali posredno vezani magnetni delci, preko katerih se vrši selekcija v zunanjem magnetnem polju. V primeru kompleta Diamond CD133 isolation kit so superparamagnetni delci, tako imenovani MACS MicroBeads, veliki okoli 50 nm in sestavljeni iz biorazgradljivega

materiala. Ločevanje poteka v kolonah z matrico, ki ob prisotnosti zunanjega magnetnega polja povzroči nastanek visoko gradientnega magnetnega polja, v katerega se ujamejo tudi celice, označene z minimalnim številom magnetnih delcev MACS MicroBeads. Neoznačene celice potujejo neovirano skozi kolono, označene celice pa lahko speremo iz kolone, potem ko le to odstranimo iz magnetnega polja (Miltenyi Biotech, 2008).

Diamond CD133 isolation kit je namenjen dvostopenjski izolaciji CD133 pozitivnih celic iz MNC, pridobljenih iz vzorcev kostnega mozga, popkovnične krvi ali periferne krvi. V prvem koraku z negativno selekcijo odstranimo vse celice, ki izražajo površinske označevalce linijsko usmerjenih celic (Lin⁺): CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD61, CD235a (Glikoforin A). Za posredno označevanje celic uporabimo mešanico biotiniliranih protiteles, specifičnih za prej naštete označevalce. Na ta protitelesa pa se vežejo magnetni delci MACS MicroBeads, ki so specifični za biotin. Po magnetni selekciji zberemo populacijo celic, negativnih za linijske označevalce (Lin⁻). Te v naslednjem koraku neposredno označimo z magnetnimi delci MACS MicroBeads, specifičnimi za CD133. Po magnetni selekciji v koloni ostanejo CD133 pozitivne celice, ki jih izven magnetnega polja z batom speremo iz kolone. Po dveh stopnjah izolacije dobimo zelo dobro prečiščeno populacijo CD133 pozitivnih celic (Miltenyi Biotech, 2008).



Slika 6: Dvostopenjska imunomagnetna izolacija CD133 pozitivnih celic. Celice najprej posredno označimo s kombinacijo biotiniliranih protiteles, specifičnih za linijske označevalce, in magnetnih delcev MACS MicroBeads, specifičnih za biotin (a). Z magnetnim ločevanjem odstranimo Lin⁺ celice, ki ostanejo v koloni, ter postopek nadaljujemo z zbranimi Lin⁻ celicami (b). Linijsko neusmerjene celice nato neposredno označimo z magnetnimi delci MACS MicroBeads, specifičnimi za CD133 (c). Z magnetnim ločevanjem speremo neoznačene celice (d). CD133 pozitivne celice izven magnetnega polja z batom speremo iz kolone (e) (Miltenyi Biotech, 2008).

Preglednica 4: Seznam površinskih antigenov značilnih za linijsko usmerjene celice, ki jih prepozna »Diamond CD133 isolation kit« (Pernick, 2010a, 2010b, 2010c).

Površinski antigen	Celični tipi, ki izražajo površinski antigen
CD2	timociti, zrele periferne celice T, naravne celice ubijalke, timusne celice B
CD3	timociti, periferne celice T,
CD11b	folikularne dendritične celice, mieloidna celična linija od promileocitov naprej, granulociti, makrofagi, naravne celice ubijalke, nekatere celice T in B
CD14	makrofagi, monociti, granulociti (šibko), Langerhansove celice, dendritične celice, B-celice
CD15	nevtrofilci, eozinofilci, aktivirane celice B in T, monociti
CD16	celice naravne ubijalke, granulociti, makrofagi, T-celice, nezreli timociti, nevtrofilci
CD19	celice B, folikularne dendritične celice
CD56	naravne celice ubijalke, aktivirane celice T, veliki granularni limfociti
CD61	trombociti, megakariociti, mieloidne predniške celice
CD235a	eritroidne celice

Pred začetkom smo si pripravili pufer za spiranje (2 mM EDTA in 0,5% BSA v pufru D-PBS) in ga ohladili na 4°C. S celicami smo rokovali hitro, jih ohranjali hladne in uporabljali predhodno ohlajene reagente, s čimer smo preprečili nespecifično vezavo protiteles na celice. Vzorci MNC ne smejo vsebovati nobenih skupkov, ki lahko zamašijo kolono in zmanjšajo učinkovitost ločbe. Zato smo po potrebi celično suspenzijo spustili skozi najlonsko sito s porami velikosti 40 µm (BD Bioscience, ZDA). Nadaljnji protokol je napisan za 5×10^7 celic, količino uporabljenih kemikalij pa smo sorazmerno prilagodili dejanskemu številu celic.

V vzorcih MNC smo najprej določili koncentracijo celic na napravi Vi-Cell. Iz suspenzije celic smo glede na želeno število celic odvzeli ustrezen volumen celične suspenzije, ga prenesli v novo centrifugirko in centrifugirali 10 minut pri $200 \times g$. Po centrifugiranju smo povsem odstranili supernatant in resuspendirali pelet v 200 µl pufru za spiranje. Celični suspenziji smo dodali 50 µl mešanice biotiniziranih protiteles, specifičnih za označevalce linijsko usmerjenih celic, dobro premešali in inkubirali 10 minut na 4°C. Po inkubaciji smo v centrifugirko dodali 5 ml pufru za spiranje in centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$. Po centrifugiranju smo popolnoma odstranili supernatant, resuspendirali pelet v 400 µl pufru za spiranje, dodali 100 µl magnetnih delcev MACS MicroBeads, specifičnih za biotin in inkubirali 15 minut na 4°C. Po inkubaciji smo v centrifugirko dodali 10ml pufru za spiranje in centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$. Po centrifugiranju smo popolnoma odstranili supernatant in do 10^8 celic resuspendirali v 1000 µl pufru za spiranje. V magnetni nosilec MidiMACS smo vstavili LD kolono, jo sprali z 2 ml pufru za spiranje in nanjo nanesti pripravljeno suspenzijo celic. Kolono smo še dvakrat sprali z 1 ml pufru za spiranje in na koncu zbrali celotno frakcijo linijsko neusmerjenih celic (Lin-) (Miltenyi Biotech, 2010).

Del linijsko neusmerjenih celic smo uporabili za analizo na pretočnem citometru in štetje na napravi Vi-Cell. Iz preostanka celične suspenzije smo izolirali CD133 pozitivne celice. Najprej smo suspenzijo centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$ ter popolnoma odstranili supernatant. Pelet smo resuspendirali v 200 µl pufru za spiranje, dodali 50 µl magnetnih delcev, specifičnih za CD133, in premešali ter inkubirali 30 minut na 4°C. Po inkubaciji smo v centrifugirko dodali 5 ml pufru za spiranje in centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$. Supernatant smo zavrgli in resuspendirali pelet v 200 µl pufru za spiranje. V magnetni

nosilec Mini MACS smo vstavili MS kolono, jo sprali s 500 µl pufru za spiranje in nanjo nanесли pripravljeno celično suspenzijo. Kolono smo še štirikrat sprali s 500 µl pufru za spiranje. Po spiranju smo kolono odstranili iz magneta, nanесли nanjo še 1 ml pufru za spiranje in z batom potisnili CD133 pozitivne celice iz kolone (Miltenyi Biotech, 2010).

3.3.5.1 Titracija biotiniliranega protitelesa anti-CD45

Pri izolaciji linijsko neusmerjenih celic z uporabo Diamond CD133 isolation kit smo želeli hkrati odstraniti tudi celice, ki izražajo splošni levkocitni označevalec CD45. Sam komplet »Diamond CD133 isolation kit« ne vsebuje anti-CD45 protitelesa, vendar pa je možno v mešanico dodati tudi dodatna protitelesa. Tako smo mi h koktajlu protiteles iz kita dodali še anti-CD45 protitelo. Na dveh vzorcih popkovnične krvi smo preizkusili kolikšna koncentracija z biotinom označenega anti-CD45 protitelesa (klon HI30, BD Biosciences, ZDA) je zadostna, da iz zbrane frakcije celic odstranimo CD45 pozitivne celice. Vsebnost CD45 pozitivnih celic v vzorcu smo preverjali s pretočno citometrijo.

Odstranitev linijsko usmerjenih celic je potekala po zgoraj opisanem protokolu, vendar ker smo morali opraviti več vzporednih imunomagnetnih selekcij, smo za začetno število izbrali manj celic. Količine v protokolu smo temu ustrezno prilagodili in za ločevanje uporabili tudi kolono z manjšo kapaciteto MS. Glede na začetno koncentracijo biotiniliranega protitelesa anti-CD45 (25 µg/ml) smo izračunali, kolikšen volumen ga je potrebno dodati pri postopku imunomagnetne selekcije, da bi dosegli želeno končno koncentracijo med mešanico ostalih protiteles proti linijsko usmerjenim celicam. V skladu s tem smo celice resuspendirali v manjšem volumnu pufru za spiranje, da nismo spreminjali koncentracije mešanice biotiniliranih protiteles proti označevalcem linijsko usmerjenih celic. V spodnji preglednici so količine dodanih reagentov, uporabljenih za ločevanje 1×10^7 celic.

Preglednica 5: Reagenti, uporabljeni pri titraciji biotiniliranega protitelesa anti-CD45 pri imunomagnetnem ločevanju 1×10^7 celic.

Končna koncentracija biotiniliranega protitelesa anti-CD45 (µg/ml)	0	1	2	4	6
Volumen dodanega biotiniliranega protitelesa anti-CD45 (µl)	0	2	4	8	12
Volumen mešanice biotiniliranih protiteles proti označevalcem linijsko usmerjenih celic (µl)	10	10	10	10	10
Volumen pufru za spiranje (µl)	50	48	46	42	38

V vzorcih smo z napravo Vi-Cell določili koncentracijo celic in vsebnost CD45+ celic preverili z analizo na pretočnem citometru. V epruvetah za analizo na pretočnem citometru smo vzorce pripravili tako, da v 50 µl pufru za spiranje število celic ni preseglo 5×10^5 celic. Dodali smo 10 µl protiteles anti-CD45 označenih s fluorescein izotiacianatom (FITC) (klon HI30, BD Biosciences, ZDA). Vsak vzorec smo za preverjanje nespecifičnih vezav vzporedno označili tudi z izotipsko kontrolo (klon MOPC-21, BD Biosciences, ZDA), ki smo jo dodali v enaki koncentraciji kot specifično protitelo. V vzorec smo tako dodali 1,25 µl izotipske kontrole in dodali še 8,75 µl pufru D-PBS, da je bil končni volumen enak kot v primeru označevanja s specifičnim protitelesom. Tako pripravljene vzorce smo inkubirali 30 minut v temi na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo v epruvete dodali 3 ml pufru D-PBS in centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in pelet resuspendirali v nekaj kapljicah pufru D-PBS. Vzorce smo analizirali s pretočnim

citometrom FACS Calibur (BD Bioscience, ZDA). Za merjenje parametrov FSC in SSC ter detekcijo fluorokromov FITC smo uporabili laser z valovno dolžino 488 nm. Za analizo rezultatov smo uporabili programsko opremo Cell Quest (BD Bioscience, ZDA).

3.3.6 Identifikacija populacije matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi

V vzorcih MNC, TNC in Lin- smo s pretočnim citometrom ocenili vsebnost CD133 pozitivnih in hkrati CD45 negativnih celic ter preverili še izražanje površinskega označevalca SSEA-4. Celice smo hkrati označili s protitelesi anti-CD133, konjugiranimi z alofikocianinom (APC), s protitelesi anti-CD45, konjugiranimi s fluorescein izotiacianatom (FITC) ter s protitelesi anti-SSEA-4, konjugiranimi s fikoeritriinom (PE).

V vzorcih smo z napravo Vi-Cell določili koncentracijo celic. V epruvetah za analizo na pretočnem citometru smo vzorce pripravili tako, da v 50 µl pufra za spiranje število celic ni preseglo 5×10^5 celic. V preglednici 6 so predstavljene količine protiteles, ki smo jih dodali na 50 µl vzorca.

Preglednica 6: Protitelesa, uporabljena za označevanje celic za 50 µl vzorca.

Reagent	Začetna koncentracija (µg/ml)	Volumen (µl)
mišje protitelo IgG1, κ, označeno s FITC proti humanemu CD45 (klon HI30, BD Bioscience, ZDA)	6,25	10
mišje protitelo IgG2b, označeno z APC proti humanemu CD133 (klon 293C3, Miltenyi Biotech, Nemčija)	8,25	5
mišje protitelo IgG3, κ, označeno s PE proti humanemu SSEA-4 (klon MC813-70, BD Bioscience, ZDA)	1,5	10
D-PBS	/	1,6

Vsak vzorec smo vzporedno označili tudi z ustreznimi izotipskimi kontrolami, da smo preverili nespecifične vezave protiteles na celice. V primeru protitelesa anti-CD45 izotipske kontrole nismo uporabili, saj je jasno vidno kje je meja med pozitivno in negativno populacijo celic. Poleg tega nam je CD45+ populacija celic služila kot osnova za ocenjevanje nespecifičnih vezav preostalih dveh protiteles. Za izotipske kontrole smo uporabili enake koncentracije protiteles, kot pri označevanju s specifičnimi protitelesi. Po potrebi smo dodali ustrezen volumen pufra D-PBS, da smo ohranili enake koncentracije uporabljenih protiteles. Protitelesa uporabljena za 50 µl vzorca so predstavljena v spodnji preglednici.

Preglednica 7: Protitelesa, uporabljena za preverjanje nespecifičnih vezav protiteles za 50 µl vzorca.

Reagent	Začetna koncentracija (µg/ml)	Volumen (µl)
mišje protitelo IgG1, κ, označeno s FITC proti humanemu CD45 (klon HI30, BD Bioscience, ZDA)	6,25	10
mišja izotipska kontrola IgG2b, označena s APC (klon G155-178, BD Bioscience, ZDA)	6,25	6,6
mišja izotipska kontrola IgG3, κ, označena s PE (klon A112-3, BD Bioscience, ZDA)	50	10 (iz založne raztopine s koncentracijo 1,5 µg/ml)
D-PBS	/	/

Tako pripravljene vzorce smo inkubirali 30 minut v temi na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo v epruvete dodali 3 ml pufra D-PBS in centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in pelet resuspendirali v nekaj kapljicah pufra D-PBS. Vzorce smo analizirali z ločevalnikom fluorescenčno označenih celic FACS Aria (BD Bioscience, ZDA). Za merjenje parametrov FSC in SSC ter detekcijo fluorokromov FITC in PE smo uporabili laser z valovno dolžino 488 nm in sistem detektorjev, razporejenih v osemkotnik (oktagon). Za detekcijo fluorokroma APC smo uporabili laser z valovno dolžino 633 nm in sistem detektorjev, razporejenih v trikotnik (trigon). Za analizo rezultatov smo uporabili programsko opremo FACS Diva (BD Bioscience, ZDA).

3.3.6.1 Določitev območja za analizo s pretočnim citometrom

Pred analizo na pretočnem citometru tako pripravljenih vzorcev smo morali določiti še območje za analizo na točkovnem diagramu, ki prikazuje velikost in granuliranost celic. Te celice so namreč velike le okoli $6,75 \mu m$, tako da je potrebno to območje vključiti v analizo na pretočnem citometru, saj se ponavadi predpostavlja, da se tam nahajajo zgolj ostanki celic in smeti. Mi smo za referenco uporabili trombocite, ki so najmanjše celice v krvi. Vse frakcije popkovnične krvi smo posebej označili s protitelesi anti-CD61, konjugiranimi z barvilom FITC (BD Biosciences, ZDA). V epruvetah za analizo na pretočnem citometru smo vzorce pripravili tako, da v $50 \mu l$ pufra za spiranje število celic ni preseglo 5×10^5 celic. V vsak vzorec smo nato dodali $10 \mu l$ protitelesa anti-CD61. Tako pripravljene vzorce smo inkubirali 30 minut v temi na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo v epruvete dodali 3 ml pufra D-PBS in centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in pelet resuspendirali v nekaj kapljicah pufra D-PBS. Vzorce smo analizirali z ločevalnikom fluorescenčno označenih celic FACS Aria (BD Bioscience, ZDA). Na grafu FSC/SSC smo določili območje, ki je vsebovalo skoraj vse CD61+ celice.

3.3.6.2 Izračun kompenzacije

Pri analizi vzorcev, označenih z več fluorokromi hkrati, je potrebno upoštevati prekrivanje emisijskih spektrov fluorokromov. Emisija prvega fluorokroma lahko sega v območje merjenja emisije drugega fluorokroma, zaradi česar lahko izmerimo preveliko intenziteto drugega fluorokroma. V praksi to težavo odpravimo s tako imenovano kompenzacijo. Vzorce pobarvamo z vsakim fluorokromom posebej in izmerimo emisijo na vseh detektorjih ter s programsko opremo pretočnega citometra določimo prekrivanje emisijskih spektrov.

Za izračun kompenzacije smo uporabili komplet BD™ CompBead Plus (BD Bioscience, ZDA), ki vsebuje polistirenske delce, specifične proti κ verigi mišjih imunoglobulinov, in delce brez vezavnih sposobnosti. Pripravili smo si štiri epruvete, eno za vsak fluorokrom in eno za neoznačeni vzorec. V vsako smo dodali $50 \mu l$ pufra za spiranje, eno kapljico raztopine z delci proti mišjim Ig, κ ter kapljico raztopine z delci brez vezavnih sposobnosti. V epruvete smo dodali enako količino protiteles, kot smo jih dodali pri označevanju ostalih vzorcev (Preglednica 8). Vzorce smo dobro premešali in inkubirali 30 min v temi na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo dodali v epruvete po 3ml pufra D-PBS in centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in resuspendirali pelet v nekaj kapljicah pufra D-PBS (BD Bioscience, 2010). Vzorce smo analizirali z ločevalnikom fluorescenčno označenih celic FACS Aria pri enakih nastavitvah detektorjev, kot smo jih uporabili za določanje vsebnosti matičnih celic. Kompenzacijo smo določili s

programsko opremo BD FACSDiva (BD Bioscience, ZDA) z uporabo možnosti za samodejni izračun kompenzacije.

Preglednica 8: Vzorci, uporabljeni za izračun kompenzacije.

Oznaka vzorca	Protitelo	Volumen (μl)
FITC	mišje protitelo IgG1, κ, označeno s FITC proti humanemu CD45 (klon HI30, BD Bioscience, ZDA)	10
APC	mišje protitelo IgG2b, označeno z APC proti humanemu CD133 (klon 293C3, Miltenyi Biotech, Nemčija)	5
PE	mišje protitelo IgG3, κ, označeno s PE proti humanemu SSEA-4 (klon MC813-70, BD Bioscience, ZDA)	10
Neobarvan	/	/

3.3.7 Ločevanje fluorescenčno označenih celic

Za izolacijo CD133+, CD45-, Lin- celic smo uporabili tri korake ločevanja. V prvem smo iz vzorca popkovnične krvi z lizo eritrocitov izolirali TNC; v drugem smo z uporabo kita »Diamond CD133 isolation kit« z imunomagnetno selekcijo odstranili vse linijsko usmerjene celice, v tretjem pa smo z uporabo ločevalnika fluorescenčno označenih celic (FACS, angl. fluorescence activated cell sorter) izolirali CD133+, CD45-, Lin- populacijo celic. Za ločevanje s FACS smo s protitelesi označili frakciji celic TNC in Lin-. Uporabili smo protitelesa anti-CD133, označena z APC, protitelesa anti-SSEA-4, označena s PE in protitelesa anti-CD45, označena s FITC. Poleg tega smo za označevanje linijsko usmerjenih celic smo uporabili mešanico biotiniziranih protiteles proti linijskim označevalcem iz »Diamond CD133 isolation kit« na katere smo vezali sekundarna protitelesa proti biotinu, označena z barvilom FITC. Z analizo frakcije TNC smo preverili vsebnost CD133+, CD45-, Lin-, celic v vzorcu popkovnične krvi, in hkrati nastavili vse potrebne parametre za ločevanje. Samo izolacijo CD133+, CD45-, Lin- celic pa smo izvedli iz frakcije Lin- celic.

V vzorcih smo najprej z napravo Vi-CELL določili koncentracijo celic. V epruvetah za analizo na pretočnem citometru smo vzorce pripravili tako, da v 50 μl pufra za spiranje število celic ni preseglo 1×10^6 celic. Če je vzorec vseboval več celic, smo dodali ustrezno količino pufra za spiranje. V preglednici 9 so predstavljene količine protiteles, ki smo jih dodali na 50 μl vzorca.

Preglednica 9: Protitelesa uporabljena za označevanje celic za 50 μl vzorca.

Reagent	Začetna koncentracija (μg/ml)	Volumen (μl)
mišje protitelo IgG1, κ, označeno s FITC proti humanemu CD45 (klon HI30, BD Bioscience, ZDA)	6,25	10
mišje protitelo IgG2b, označeno z APC proti humanemu CD133 (klon 293C3, Miltenyi Biotech, Nemčija)	8,25	5
mišje protitelo IgG3, κ, označeno s PE proti humanemu SSEA-4 (klon MC813-70, BD Bioscience, ZDA)	1,5	10
mešanica mišjih biotiniziranih protiteles anti-CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD61, CD235a iz »Diamond CD133 isolation kit« (Miltenyi Biotech, Nemčija)	podatek ni znan	10
D-PBS	/	1,6

Vsak vzorec smo vzporedno označili tudi z ustreznimi izotipskimi kontrolami, da smo preverili nespecifične vezave protiteles na celice. V primeru protiteles anti-CD45 in označevalcem linijsko usmerjenih celic izotipske kontrole nismo uporabili, saj je jasno vidno kje je meja med pozitivno in negativno populacijo celic. Poleg tega nam je CD45+, Lin+ populacija celic služila kot osnova za ocenjevanje nespecifičnih vezav preostalih dveh protiteles. Za izotipske kontrole smo uporabili enake koncentracije protiteles, kot pri označevanju s specifičnimi protitelesi. Po potrebi smo dodali ustrezen volumen pufra D-PBS, da smo ohranili enake koncentracije uporabljenih protiteles. Protitelesa, uporabljena za 50 µl vzorca, so predstavljena v preglednici 10.

Preglednica 10: Protitelesa, uporabljena za preverjanje nespecifičnih vezav protiteles za 50 µl vzorca.

Reagent	Začetna koncentracija (µg/ml)	Volumen (µl)
mišje protitelo IgG1, κ, označeno s FITC proti humanemu CD45 (klon HI30, BD Bioscience, ZDA)	6,25	10
mišja izotipska kontrola IgG2b, označena s APC (klon G155-178, BD Bioscience, ZDA)	6,25	6,6
mišja izotipska kontrola IgG3, κ, označena s PE (klon A112-3, BD Bioscience, ZDA)	50	10 (iz založne raztopine s koncentracijo 1,5 µg/ml)
mešanica mišjih biotiniliranih protiteles anti-CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD61, CD235a iz »Diamond CD133 isolation kit« (Miltenyi Biotech, Nemčija)	podatek ni znan	10
D-PBS	/	/

Tako pripravljene vzorce smo inkubirali 20 minut v temi na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo v epruvete dodali 3 ml pufra D-PBS in centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in volumen vzorca uravnali na 100 µl (oziroma sorazmerno večjo količino, če je začetno število celic presegalo 10^7 celic). Na 100 µl vzorca smo dodali 10 µl protitelesa proti biotinu, označena s FITC (klon Bio3-18E7, Miltenyi Biotech, Nemčija), in inkubirali 5 min na 4°C. Po inkubaciji smo v epruvete dodali 3 ml pufra D-PBS in centrifugirali 10 minut pri $300 \times g$. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in pelet resuspendirali v nekaj kapljicah pufra D-PBS. Vzorce smo analizirali in sortirali z ločevalnikom fluorescenčno označenih celic FACS Aria (BD Bioscience, ZDA). Za merjenje parametrov FSC in SSC ter detekcijo fluorokromov FITC in PE smo uporabili laser z valovno dolžino 488 nm in sistem detektorjev, razporejenih v osemkotnik (oktagon). Za detekcijo fluorokroma APC smo uporabili laser z valovno dolžino 633 nm in sistem detektorjev razporejenih v trikotnik (trigon). Pri ločevanju celic iz frakcije Lin- smo poleg populacije CD133+, CD45-, Lin- celic, ki predstavljajo VSEL celice, izolirali tudi populacijo CD133+, CD45+, Lin+, ki naj bi predstavljale KMC.

4 REZULTATI

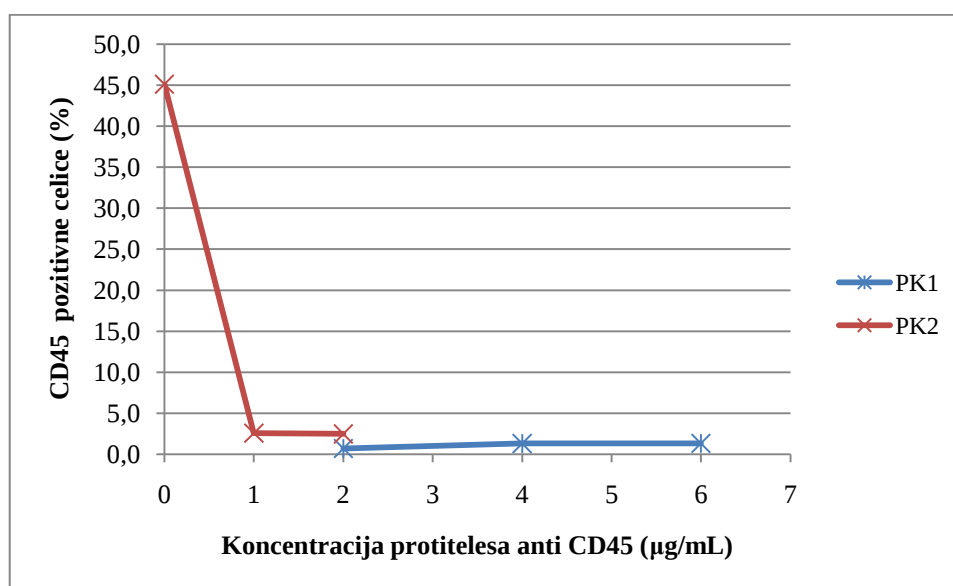
4.1 TITRACIJA BIOTINILIRANEGA PROTITELESA ANTI-CD45

Pri odstranitvi linijsko usmerjenih celic z uporabo »Diamond CD133 isolation« kita smo želeli hkrati odstraniti tudi celice, ki izražajo splošni levkocitni označevalec CD45. Sam komplet »Diamond CD133 isolation kit« ne vsebuje protitelesa anti-CD45, vendar pa je možno v mešanico dodati tudi dodatna protitelesa. Tako smo mi h koktejl protiteles iz kita dodali še protitelo anti-CD45. Na dveh vzorcih popkovnične krvi (PK1 in PK2) smo preizkusili, kolikšna koncentracija z biotinom označenega anti-CD45 protitelesa je zadostna, da iz zbrane frakcije celic odstranimo CD45 pozitivne celice.

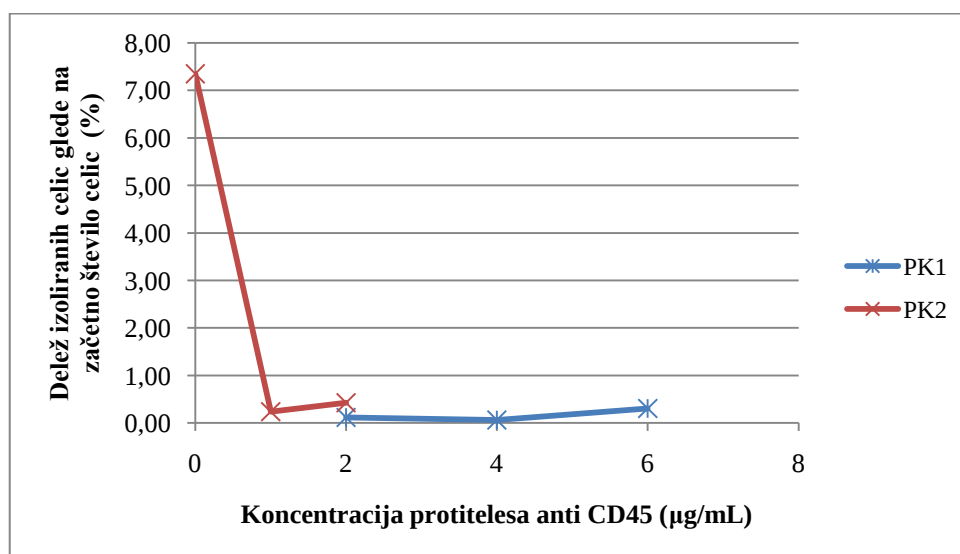
Pri analizi s pretočnim citometrom smo na histogramu, ki prikazuje število celic z različnimi intenzitetami fluorescence, označili celice, ki so pozitivne za označevalec CD45. Spodnjo mejo za detekcijo CD45 pozitivnih celic smo določili na podlagi vzorcev, označenih z izotipsko kontrolo. Pri teh vzorcih je delež celic z višjo intenziteto fluorescence od mejne vrednosti znašal manj kot 2% vseh celic. Delež CD45 pozitivnih celic smo izračunali tako, da smo od rezultata pri analizi specifičnih vezav odšteli rezultat, dobljen pri analizi nespecifičnih vezav.

Preglednica 11: Delež CD45 pozitivnih celic določenih s pretočnim citometrom ter število izoliranih celic po odstranitvi linijsko usmerjenih celic z imunomagnetno selekcijo pri različnih koncentracijah biotiniliranega protitelesa anti-CD45.

Vzorec	PK1			PK2		
Koncentracija biotiniliranega protitelesa anti-CD45 (ug/ml)	2	4	6	0	1	2
Delež CD45 pozitivnih celic brez upoštevanih nespecifičnih vezav (%)	2,2	1,7	1,7	45,2	3,3	3,0
Delež nespecifičnih vezav (%)	1,5	0,4	0,3	0,1	0,7	0,5
Delež CD45 pozitivnih celic (%)	0,7	1,3	1,3	45,1	2,6	2,5
Začetno število celic ($\times 10^6$)	10	10	10	10	10	10
Število izoliranih celic ($\times 10^4$)	1,2	0,6	3,0	73,5	2,4	4,3
Delež izoliranih celice glede na začetno število (%)	0,12	0,06	0,30	7,35	0,24	0,43



Slika 7: Odvisnost deleža CD45 pozitivnih celic od koncentracije anti-CD45 protitelesa.



Slika 8: Odvisnost števila izoliranih celic od koncentracije anti-CD45 protitelesa.

Pri koncentracijah biotiniziranega anti-CD45 protitelesa v koktajlu protiteles za deplecijo linijsko usmerjenih celic, ki so višje od 1 µg/ml je vsebnost CD45 pozitivnih celic v zbrani frakciji linijsko neusmerjenih celic iz začetnih 45,1%, padla na 2,6% in manj. Delež zbranih celic glede na začetno število celic je ob dodatku anti-CD45 protitelesa padel na 0,43% in manj.

Pri vzorcu PK2 smo preverili še učinkovitost odstranjevanja CD45 pozitivnih celic pri začetnem številu celic 5×10^7 in z uporabo kolone z večjo kapaciteto. Po ločevanju ob dodatku z biotinom označenega protitelesa anti-CD45 v končni koncentraciji 4 µg/ml smo dobili $6,6 \times 10^5$ celic, pri katerih je delež CD45 pozitivnih celic znašal 3,38%. Delež izoliranih celic glede na število začetnih celic je bil 0,13%.

4.2 DOLOČANJE VSEBNOSTI MATIČNIH CELIC Z EMBRIONALNIMI LASTNOSTMI V RAZLIČNIH FRAKCIJAH POPKOVNIČNE KRVİ

4.2.1 Število celic v različnih frakcijah popkovnične krvi

Iz majhnega dela vzorca popkovnične krvi smo z lizo eritrocitov izolirali vse jedrne celice. Iz preostalega večinskega dela pa smo izolirali MNC z uporabo gradientnega centrifugiranja. Manjši del izoliranih MNC smo tako kot izolirane TNC namenili za neposredno analizo vsebnosti matičnih celic s pretočnim citometrom. Preostale MNC smo razdelili na dva dela. Iz enega smo izolirali linijsko neusmerjene celice z uporabo Diamond CD133 isolation kit po protokolu proizvajalca. Iz drugega pa smo izolirali linijsko neusmerjene in CD45 negativne celice tako, da smo osnovnemu koktajlu dodali biotinizirano anti-CD45 protitelo v končni koncentraciji 1 µg/ml. Celice v vsaki frakciji smo prešteli s števniimi komorami za enkratno uporabo. Glede na število celic ter na volumen uporabljene popkovnične krvi za izolacijo posameznih frakcij smo izračunali koliko celic posamezne frakcije lahko predvidoma dobimo iz ml popkovnične krvi. Pri tem smo predpostavili, da učinkovitost izolacije ni odvisna od količine vzorca.

Preglednica 12: Število celic na ml popkovnične krvi pri uporabi različnih metod izolacije.

Frakcija	TNC	MNC	Lin-	Lin- CD45-
Izolirano število celic ($\times 10^6$)	3,525	176	0,177	0,015
Volumen uporabljene popkovnične krvi (ml)	2,7	64,3	21,5	21,5
Število izoliranih celic na ml popkovnične krvi ($\times 10^6$)	1,3074	2,7372	0,0082	0,0007

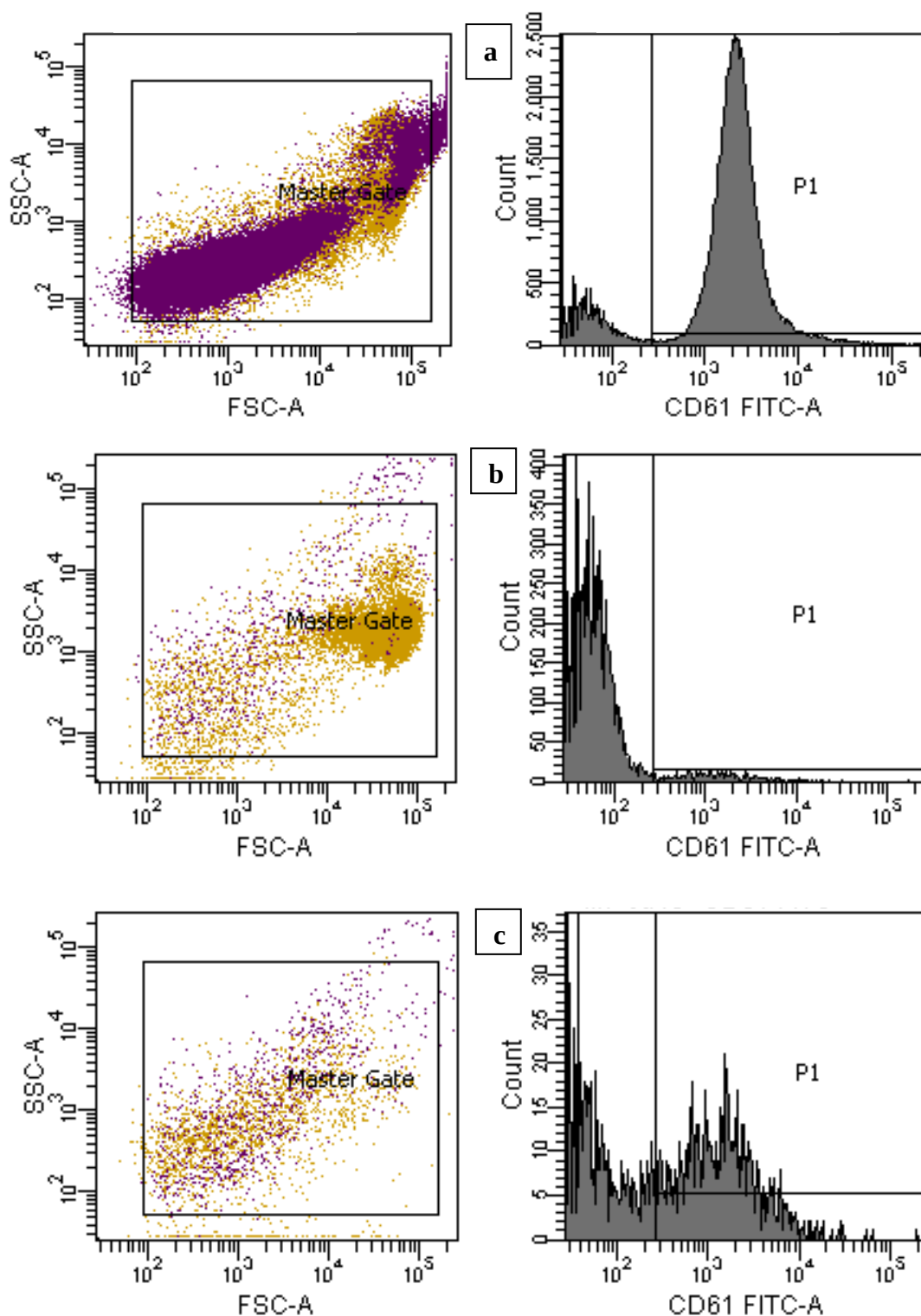
4.2.2 Izračun kompenzacije

Preglednica 13: Kompenzacija na pretočnem citometru za barvila FITC, APC in PE.

Barvilo 1	Barvilo 2	Emisija drugega barvila v območje merjenja emisije prvega barvila (%)
PE	FITC	17,43
APC	FITC	0
FITC	PE	0,93
APC	PE	0
FITC	APC	0
PE	APC	0

4.2.3 Določitev območja za analizo s pretočnim citometrom

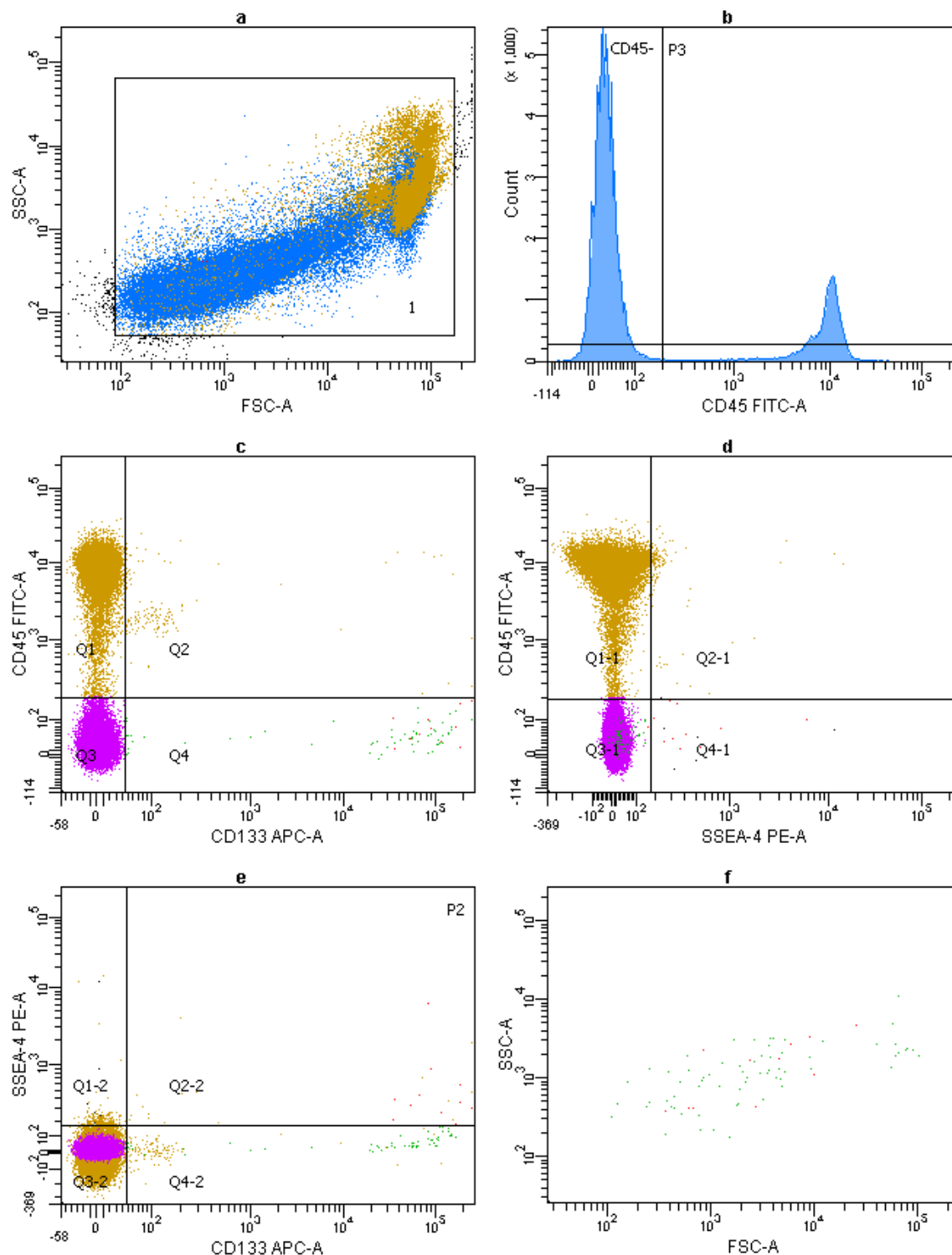
Na pretočnem citometru smo nato nadaljevali analizo tako, da smo najprej določili območje, kjer bi se lahko nahajale embrionalnim podobne celice. To smo storili preko barvanja s protitelesi anti-CD61, ki označujejo tudi trombocite, najmanjše celice, prisotne v krvi. Pri analizi na pretočnem citometru nam parameter prednjega sipanja svetlobe (FSC, angl. forward scatter), ki meri sipanje v smeri laserskega žarka, poda informacijo o velikosti celice. Parameter stranskega sipanja svetlobe (SSC, angl. side scatter), ki meri sipanje svetlobe v pravokotni smeri glede na laserski žarek, pa nam poda informacijo o granularnosti celice. Na točkovnem diagramu SSC/FSC tako lahko vidimo različne populacije celic glede na njihovo velikost in granularnost. V histogramu, ki prikazuje število zaznanih celic z določeno fluorescenco, smo označili celice, pozitivne za CD61, in jih prikazali na točkovnem diagramu FSC/SSC. Na tem diagramu smo nato določili območje, ki je zajelo skoraj vse CD61+ celice (Slika 9).



Slika 9: Prikaz analize različnih frakcij popkovnične krvi s pretočno citometrijo na podlagi označevalca CD61. Na levi točkovni diagrami SSC/FSC v vzorcih različnih frakcij popkovnične krvi (a: MNC, b: Lin-, c: Lin-, CD45-). Na desni so histogrami, na katerih so označene CD61 pozitivne celice (P1) in na levih točkovnih diagramih SSC/FSC predstavljajo temno vijolične točke, medtem ko so preostale točke oker barve.

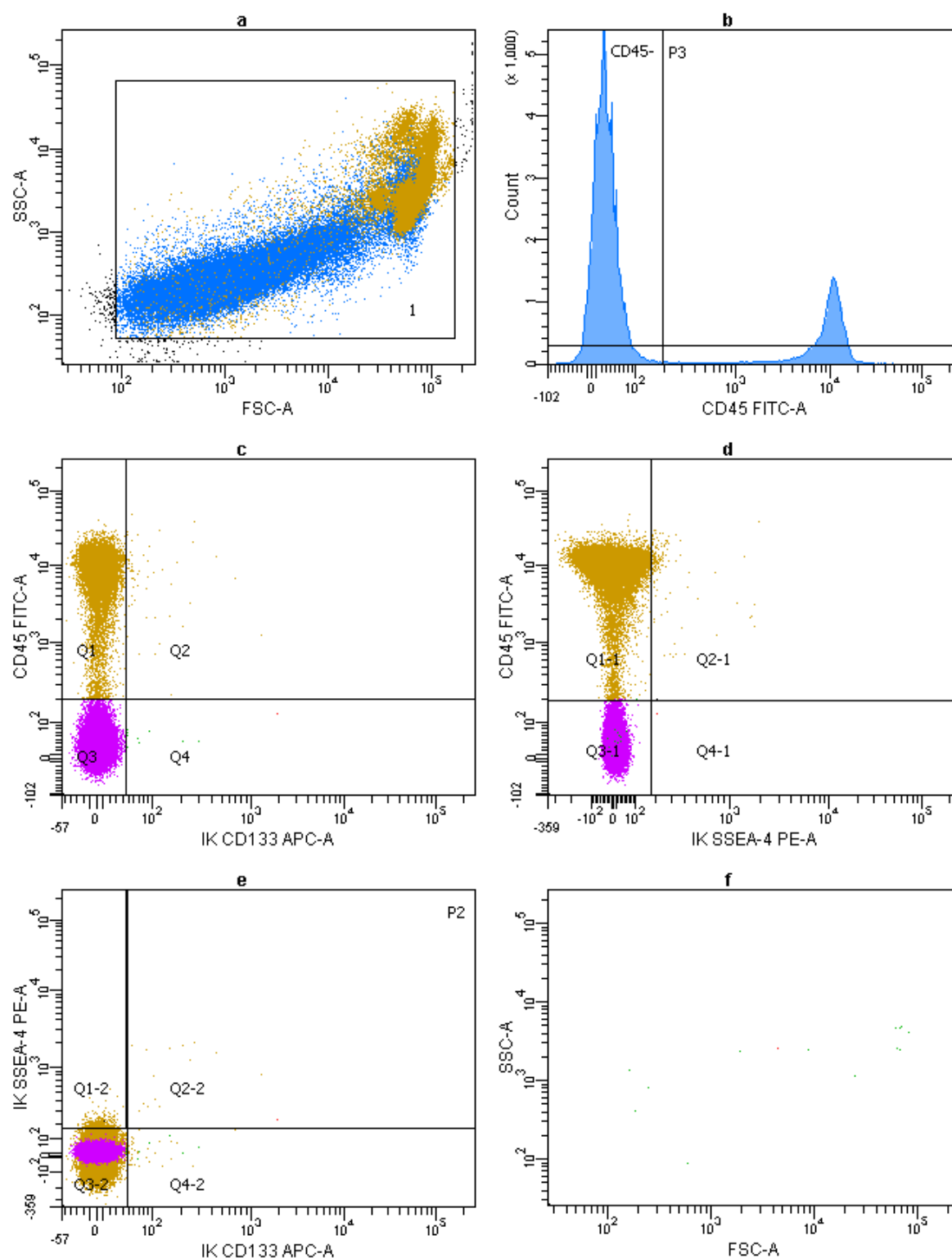
4.2.4 Analiza populacije matičnih celic s pretočnim citometrom

Na podlagi izračunane kompenzacije in določenega območja za analizo na točkovnem diagramu SSC/FSC smo lahko v popkovnični krvi analizirali različne frakcije celic, označenih s protitelesi proti označevalcem CD45, CD133 in SSEA-4.



Slika 10: Analiza populacij celic v frakciji MNC iz popkovnične krvi na podlagi označevalcev CD45, CD133 in SSEA-4 s pretočnim citometrom.

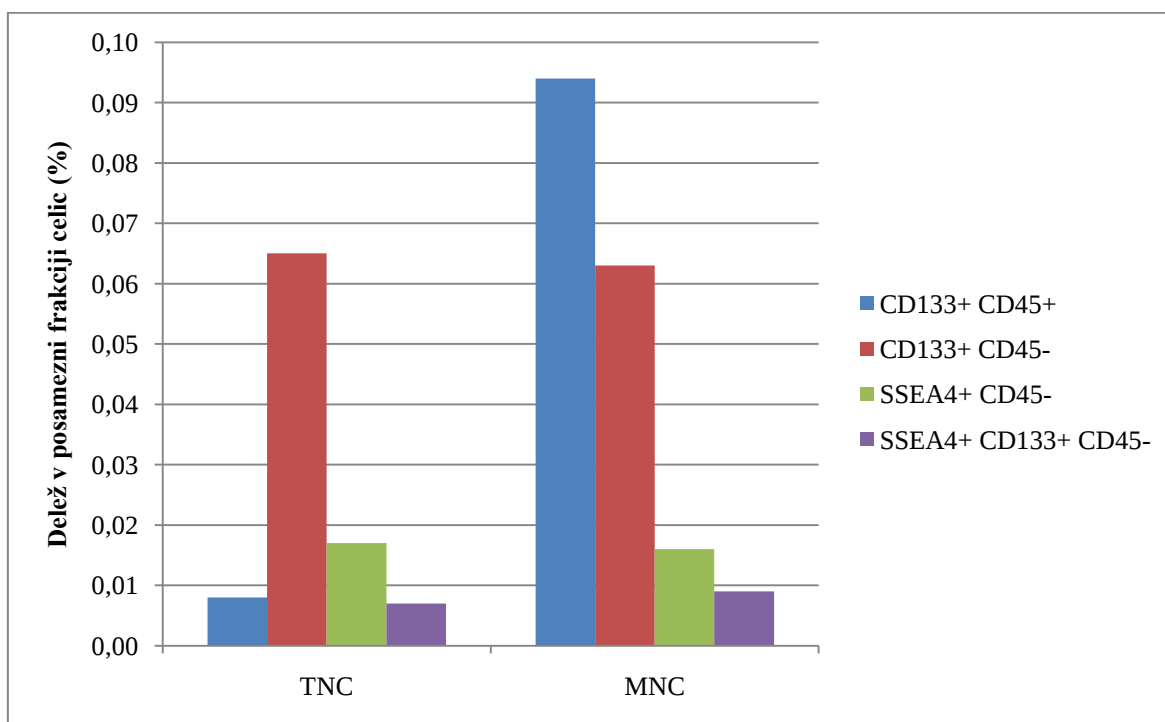
Slika 10 prikazuje analizo populacij celic s pretočnim citometrom v frakciji MNC na podlagi označevalcev CD45, CD133 in SSEA-4. Na točkovnem diagramu SSC/FSC (a) so prikazani vsi dogodki, zaznani pri analizi s pretočni citometrom. Z okvirjem je omejeno območje za nadaljnjo analizo. Na histogramu (b), ki prikazuje število celic pri različnih intenzitetah fluorescence barvila FITC (protitelesa anti-CD45), so označene vse CD45-celice, ki se nahajajo levo od navpične črte in so na ostalih diagramih prikazane z vijolično barvo. Na ostalih diagramih so glede na ta diagram vse CD45+ celice označene z oker barvo. Na točkovnem diagramu (c), ki prikazuje fluorescenco FITC (CD45) in APC (CD133), se v kvadrantu Q4 nahajajo CD133+, CD45- celice, ki so označene z zeleno barvo. V kvadrantu Q2 pa se nahajajo CD133+, CD45+ celice. Oba kvadranta skupaj predstavljata vse CD133+ celice. Na točkovnem diagramu (d), ki prikazuje fluorescenco za FITC (CD45) in PE (SSEA-4), se v kvadrantu Q4-1 nahajajo SSEA-4+, CD45- celice, ki so označene s črno barvo. V kvadrantu Q2-1 so prisotne SSEA-4+, CD45+ celice. Oba kvadranta skupaj prikazujeta vse SSEA-4+ celice. Na točkovnem diagramu (e), ki prikazuje fluorescenco za PE (SSEA-4) in APC (CD133), se v kvadrantu Q4-2 nahajajo CD133+, SSEA4+ celice, od katerih so tiste negativne za CD45 označene z rdečo. Na točkovnem diagramu SSC/FSC so prikazane CD133+, CD45- celice, določene na diagramu (f), so označene z zeleno, ter SSEA4+, CD133+ in CD45- celice, določene iz diagrama (c), ki so označene z rdečo. Delež vsake populacije glede na vse analizirane celice, ki se nahajajo znotraj okvirja na diagramu (a), smo določili s programsko opremo FACSDiva iz rezultatov analize pridobljenih podatkov.



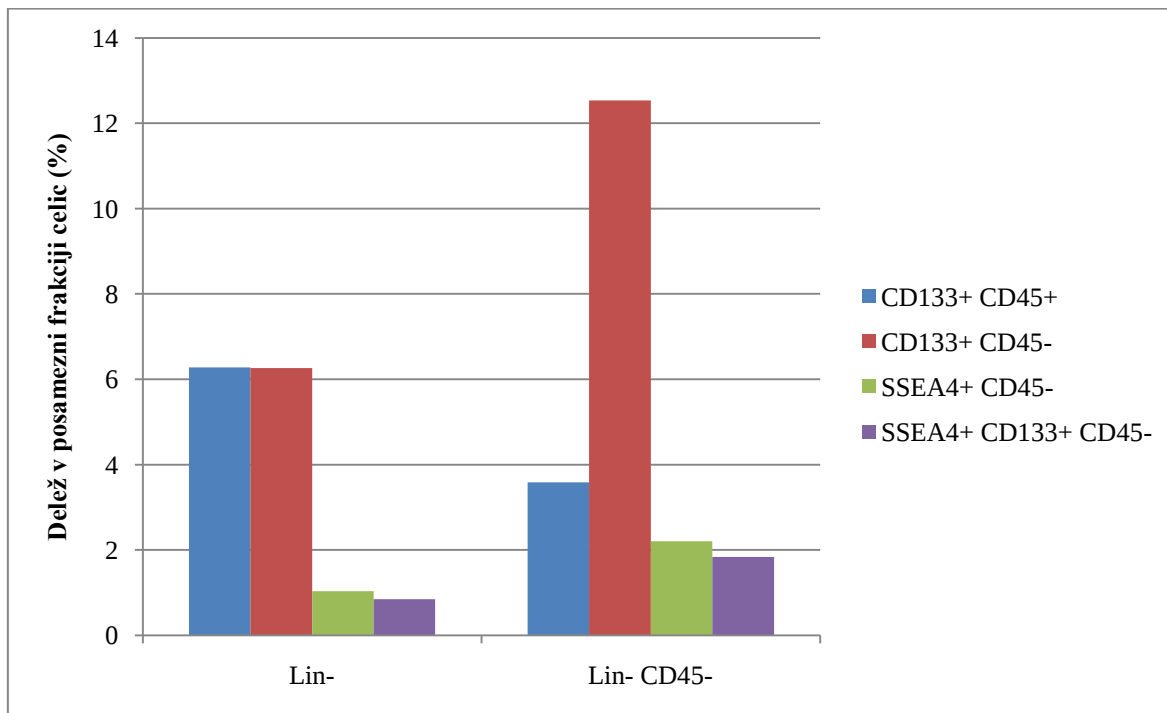
Slika 11: Analiza nespecifičnih vezav protiteles proti CD133 in SSEA-4 v frakciji MNC iz popkovnične krvi. Grafi prikazujejo enake populacije celic kot Slika 10.

Preglednica 14: Deleži posameznih populacij celic v različnih frakcijah popkovnične krvi z upoštevanimi nespecifičnimi vezavami. Z rdečo so označeni negativni rezultati, ki so posledica večjega deleža nespecifičnih vezav v primerjavi s specifičnimi in niso upoštevani pri nadaljnjih analizah.

	TNC	MNC	Lin-	Lin- CD45-
CD45+ (%)	26,92	22,56	75,42	27,04
CD133+ (%)	0,07	0,16	12,29	16,66
CD133+ CD45+ (%)	0,01	0,09	6,28	3,58
CD133+ CD45- (%)	0,07	0,06	6,27	12,54
SSEA-4+ (%)	-0,06	-0,03	2,28	6,86
SSEA-4+ CD45+ (%)	-0,03	-0,05	1,24	4,80
SSEA-4+ CD45- (%)	0,02	0,02	1,03	2,21
SSEA-4+ CD133+ CD45- (%)	0,01	0,01	0,85	1,84



Slika 12: Delež različnih populacij celic v frakcijah TNC in MNC iz popkovnične krvi.

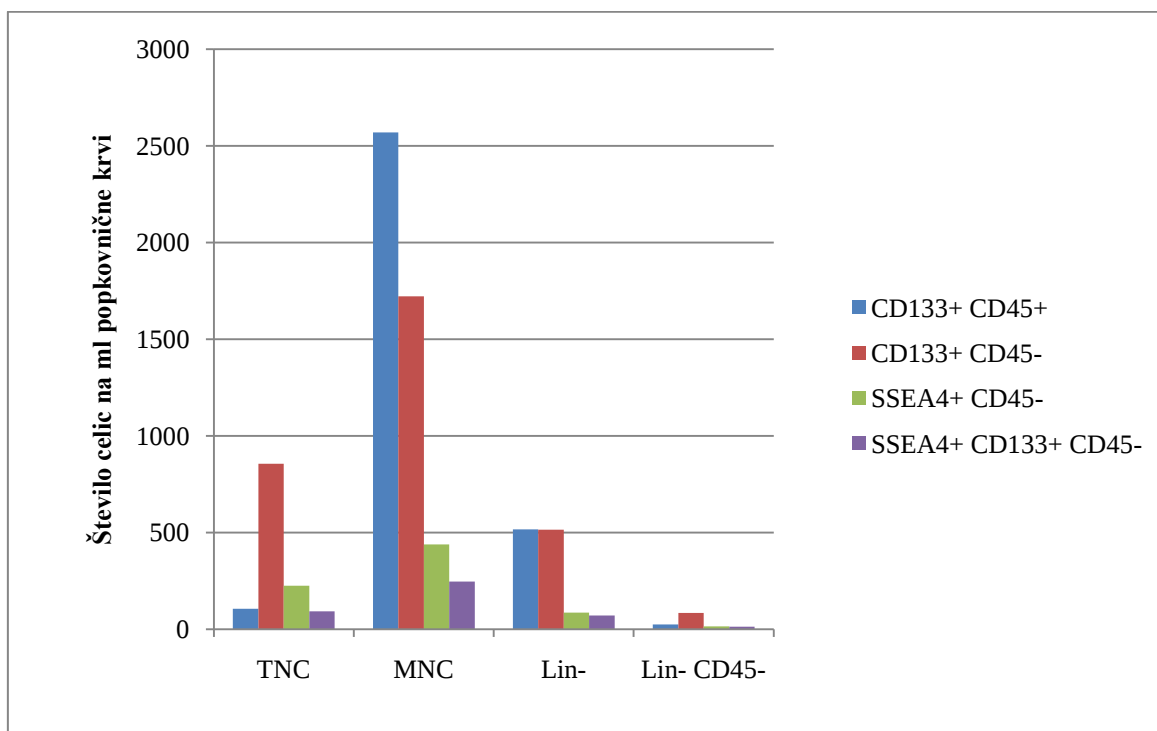


Slika 13: Delež različnih populacij celic v frakcijah Lin- in Lin-, CD45- iz popkovnične krvi.

Iz ugotovljenih deležev različnih populacij celic (Preglednica 14) in iz števila celic, ki jih dobimo z različnimi metodami izolacije (Preglednica 13), smo izračunali, kako številna je posamezna populacija celic v določeni frakciji popkovnične krvi. Pri izračunu smo predpostavili, da vsi zaznani dogodki pri analizi s pretočno citometrijo predstavljajo celice in niso posledica ostankov celic.

Preglednica 15: Predvideno število različnih populacij celic v 1 ml popkovnične krvi v frakcijah, izoliranih z različnimi metodami.

	TNC	MNC	Lin-	Lin- CD45-
CD133+ CD45+	105	2569	516	24
CD133+ CD45-	855	1722	515	85
SSEA-4+ CD45-	224	437	85	15
SSEA-4+ CD133+ CD45-	92	246	70	12



Slika 14: Predvideno število celic različnih populacij v 1 ml popkovnične krvi v frakcijah, izoliranih z različnimi metodami.

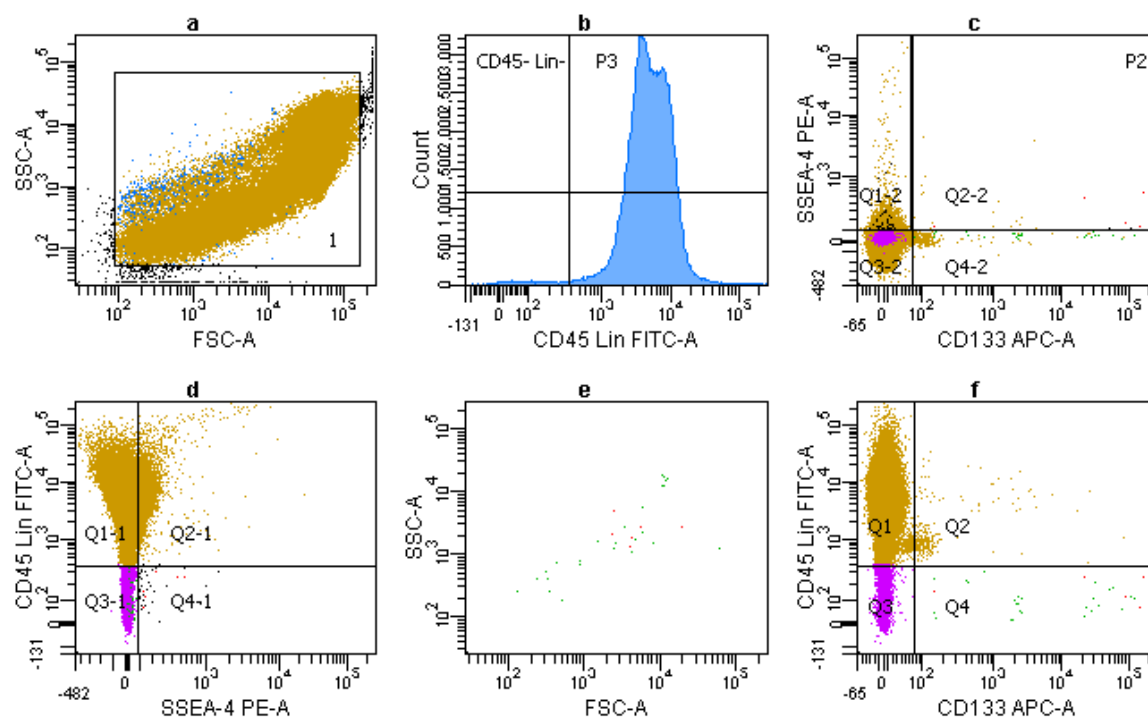
4.3 IZOLACIJA MATIČNIH CELIC Z EMBRIONALNIMI LASTNOSTMI V TREH KORAKIH

Iz vzorca popkovnične krvi z volumnom 50 ml smo poskusili izolirati matične celice z embrionalnimi lastnostmi. Najprej smo z lizo eritrocitov izolirali TNC, nato z uporabo imunomagnetne selekcije izolirali vse linijsko neusmerjene celice ter na koncu z ločevalnikom fluorescenčno označenih celic izolirali CD133+, CD45- in Lin- populacijo celic. Po prvih dveh ločevanjih smo celice prešteli z napravo Vi-Cell. Število izoliranih celic z ločevalnikom smo določili iz poročila o ločevanju.

Preglednica 16: Število celic po različnih stopnjah izolacije matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi.

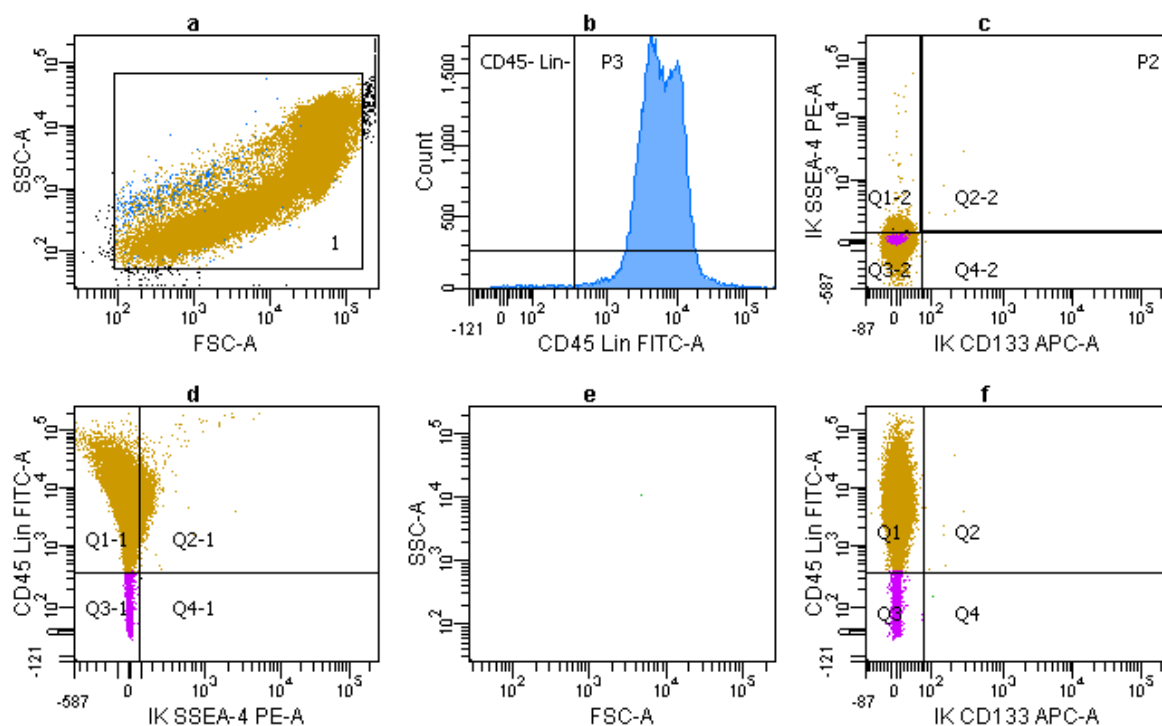
Postopek izolacije	Število celic
Liza eritrocitov	166×10^6
Imunomagnetna selekcija linijsko neusmerjenih celic	$2,32 \times 10^6$
Izolacija CD133+, CD45-, Lin- na FACS	354

Pred izolacijo matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi na ločevalniku smo analizirali njihovo vsebnost v izhodiščni populaciji TNC. Pri samem ločevanju pa smo hkrati tudi analizirali populacijo linijsko neusmerjenih celic. Tokrat smo pri ločevanju in analizi na pretočnem citometru celice dodatno označili z biotiniliranimi protitelesi proti označevalcem linijsko usmerjenih celic, na katere smo vezali sekundarno protitelo, označeno z barvilom FITC, da bi preverili, koliko linijsko usmerjenih celic še ostane po njihovi odstranitvi.

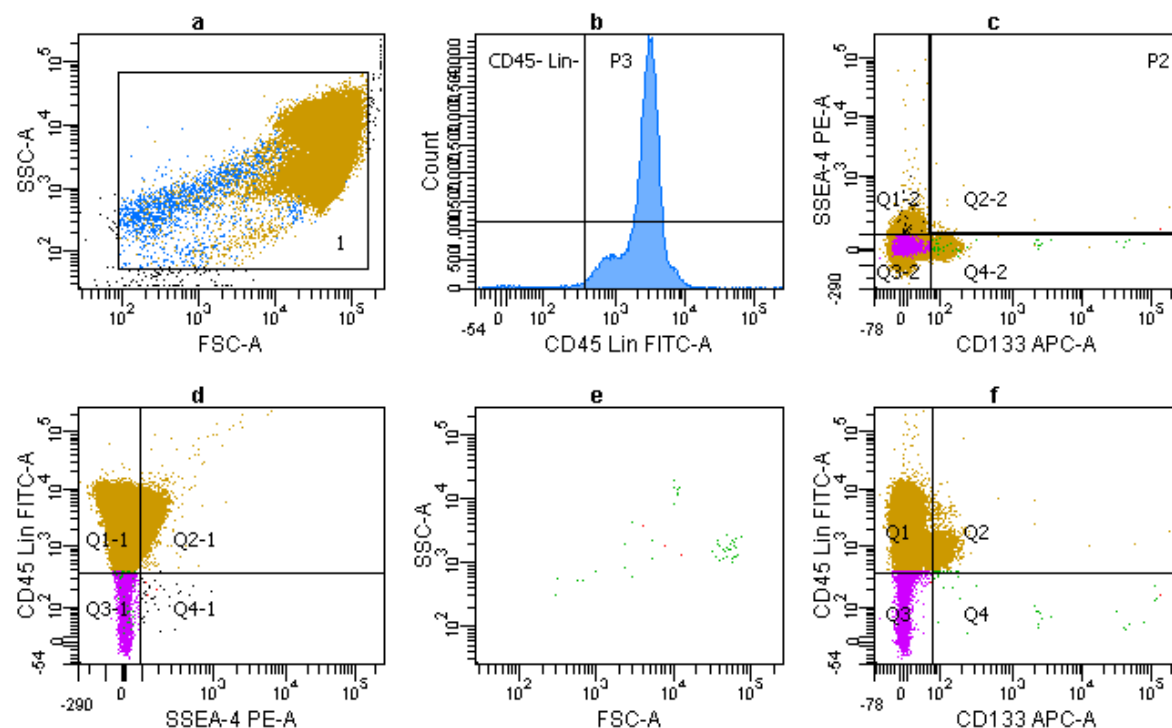


Slika 15: Analiza različnih populacij celic s pretočnim citometrom v izhodiščni populaciji TNC na podlagi označevalcev CD45, Lin, CD133 in SSEA-4.

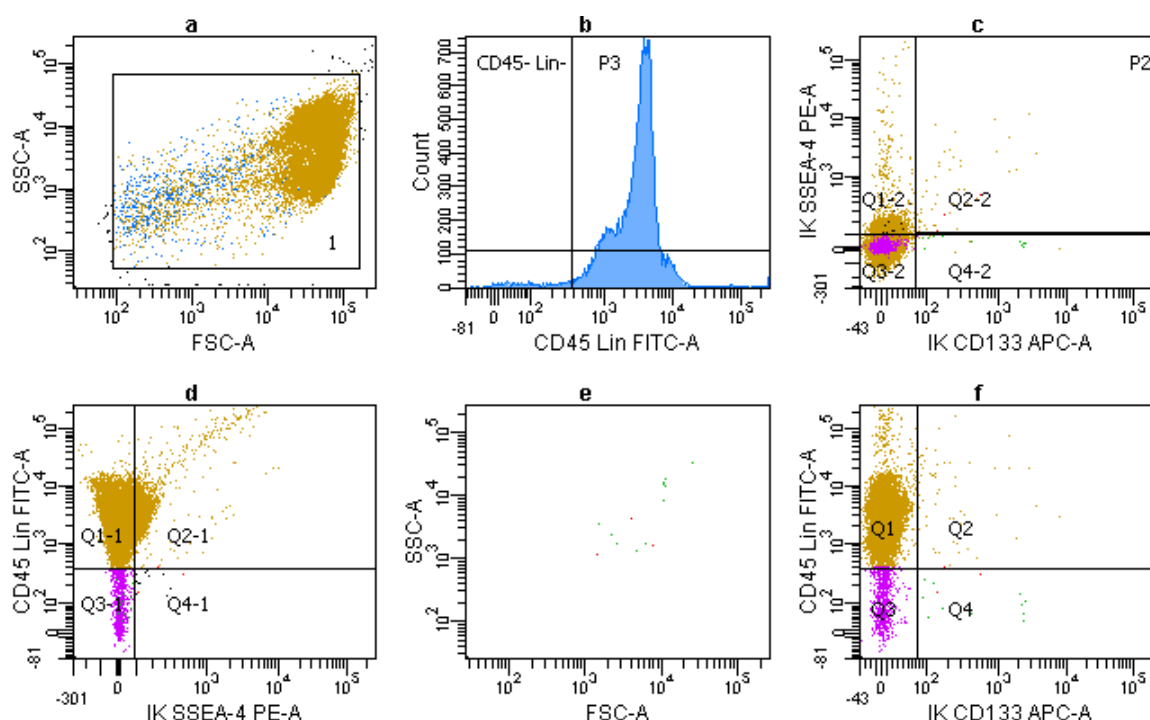
Slika 15 prikazuje analizo vsebnosti matičnih celic s pretočnim citometrom v izhodiščni populaciji TNC na podlagi označevalcev CD45, Lin, CD133 in SSEA-4. Na točkovnem diagramu SSC/FSC (a) so prikazani vsi dogodki, zaznani pri analizi s pretočnim citometrom. Z okvirjem je omejeno območje za nadaljnjo analizo. Na histogramu (b), ki prikazuje število celic pri različnih intenzitetah fluorescence barvila FITC (protitelesa proti CD45 in Lin), so označene vse CD45-, Lin- celice, ki se nahajajo levo od navpične črte in so na ostalih diagramih prikazane z vijolično barvo. Na ostalih diagramih so glede na ta diagram vse CD45+ Lin+ celice označene z oker barvo. Na točkovnem diagramu (c), ki prikazuje fluorescenco za PE (SSEA-4) in APC (CD133), se v kvadrantu Q4-2 nahajajo CD133+, SSEA4+ celice, od katerih so tiste negativne za CD45 in Lin označene z rdečo. Na točkovnem diagramu (d), ki prikazuje fluorescenco za FITC (CD45 in Lin) in PE (SSEA-4), se v kvadrantu Q4-1 nahajajo SSEA-4+, CD45-, Lin- celice, ki so označene s črno barvo. V kvadrantu Q2-1 so prisotne SSEA-4+, CD45+, Lin+ celice. Oba kvadranta skupaj prikazujeta vse SSEA-4+ celice. Na točkovnem diagramu SSC/FSC (e) so prikazane CD133+, CD45-, Lin- celice določene na diagramu (f), ki so označene z zeleno, ter SSEA4+, CD133+ in CD45-, Lin- celice, določene iz diagrama (c), ki so označene z rdečo. Na točkovnem diagramu (f), ki prikazuje fluorescenco FITC (CD45, Lin) in APC (CD133), se v kvadrantu Q4 nahajajo CD133+, CD45-, Lin- celice, ki so označene z zeleno barvo. V kvadrantu Q2, pa se nahajajo CD133+, CD45+, Lin+ celice. Oba kvadranta skupaj predstavljata vse CD133+ celice. Delež vsake populacije glede na vse analizirane celice, ki se nahajajo znotraj okvirja na diagramu (a), smo določili s programsko opremo FACSDiva iz rezultatov analize pridobljenih podatkov.



Slika 16: Analiza nespecifičnih vezav v izhodiščni populaciji TNC. Prikazane so enake populacije kot na sliki 14.



Slika 17: Analiza različnih populacij celic s pretočnim citometrom v frakciji Lin na podlagi označevalcev CD45, Lin, CD133 in SSEA-4. Prikazane so enake populacije kot na sliki 14.



Slika 18: Analiza nespecifičnih vezav v frakciji Lin⁻. Prikazane so enake populacije kot na sliki 14.

Delež za vsako populacijo celic v frakcijah popkovnične krvi TNC in Lin⁻ (Preglednica 17) je podan glede na vse analizirane celice. Dobimo ga tako, da od rezultata pri analizi specifičnih vezav odštejemo rezultat, dobljen pri analizi nespecifičnih vezav. Zraven je podano tudi razmerje med izmerjenimi nespecifičnimi vezavami in specifičnimi vezavami, ki predstavlja zanesljivost meritve. Rezultati, pri kateri so nespecifične vezave večje od specifičnih, so označene z rdečo.

Preglednica 17: Analiza rezultatov na pretočnem citometru za različne populacije celic pri dveh stopnjah izolacije.

Populacija celic	TNC		Lin-	
	delež med vsemi celicami (%)	nespec. /spec (%)	delež med vsemi celicami (%)	nespec. /spec. (%)
Lin- CD45-	1,379	4,5	1,8	ni podatka
CD133+	0,257	7,6	3,214	12,2
CD133+ Lin+ CD45+	0,238	6,7	3,247	10,5
CD133+ Lin- CD45-	0,019	17,4	-0,033	206,5
SSEA-4+	1,532	77,0	1,628	90,7
SSEA-4+ Lin+ CD45+	1,511	77,3	1,626	90,7
SSEA-4+ Lin- CD45-	0,021	0,0	0,002	93,8
SSEA-4+ CD133+ Lin- CD45-	0,004	0,0	-0,001	125,0

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Raziskave so v zadnjem času pokazale, da se v odraslem telesu nahajajo celice, ki imajo velik diferenciacijski potencial. Identificirane so bile v več odraslih tkivih. Mednje spadajo tudi VSEL, za katere se domneva, da imajo v odraslih tkivih vlogo pri zdravljenju poškodb in obnavljanju tkiva. VSEL se nahajajo tudi v humani popkovnični krvi in periferni krvi, kjer se njihova mobilizacija poveča ob prisotnosti poškodb, kot je na primer srčni infarkt. VSEL izražajo označevalce, značilne za pluripotentne matične celice Oct-4, Nanog, SSEA-4 in jih zato povezujejo z EMC. Vendar pa se nahajajo v odraslih tkivih v zelo majhnem številu, kar močno otežuje njihovo nadaljnje raziskovanje in uporabo (Kucia in sod., 2007a; Kucia in sod., 2008).

VSEL v popkovnični krvi predstavljajo le 0,04% vseh jedrnih celic. Lahko izražajo površinske označevalce, kot so CD133, CXCR4 in CD34, in ne izražajo označevalcev, značilnih za linijsko usmerjene celice (CD19, CD2, CD3, CD14, CD66b, CD24, CD16, CD56, CD235a), in skupnega označevalca vseh levkocitov (CD45). Izmed vseh so najbolj primitivne tiste, ki izražajo CD133, saj so najmanjše, imajo največje razmerje med površino jedra in površino citoplazme ter tudi najbolj izražajo pluripotentne označevalce. Te celice so hkrati v popkovnični krvi tudi najbolj redke in predstavljajo okoli 0,012% vseh celic z jedrom. Od teh so tiste, ki poleg CD133 izražajo tudi površinski označevalec embrionalnih matičnih celic SSEA-4, še bolj redke (0,0016% TNC) in kažejo še bolj primitivne značilnosti (Zuba-Surma in sod., 2010).

Zaradi majhnega števila VSEL v popkovnični krvi je njihova izolacija zelo zahtevna. Ob vseh upoštevanih priporočilih lahko iz vzorca z volumnom med 50 in 100 ml izoliramo od 10^4 do 2×10^4 VSEL. Zaradi njihove majhnosti moramo biti še posebej pazljivi pri začetnih izolacijah MNC celic. Uporaba gradientnega centrifugiranja ni priporočena, saj VSEL zaradi njihove velike specifične gostote hitro izgubimo. Tako je za izolacijo TNC priporočena uporaba lize eritrocitov. Vendar pa na ta način dobimo tudi večje število celic – predvsem linijsko diferenciranih, saj se pri lizi ne znebimo granulocitov, ki jih z gradientnim centrifugiranjem uspešno odstranimo. To pa se odraža v večji porabi protiteles in v daljšem času, potrebnem za izolacijo VSEL. Ločevanje iz začetne populacije TNC bi lahko trajalo tudi več dni. Zato je priporočena uporaba predhodne imunomagnetne selekcije, ki skrajša potreben čas za izolacijo na 5 ur. Za korak imunomagnetne selekcije se lahko uporabi ali pozitivno selekcijo na označevalec CD133 ali pa z odstranitvijo vseh linijsko usmerjenih celic (Zuba-Surma in sod., 2010; Zuba-Surma in Ratajczak, 2010).

Po pregledu komercialno dostopnih sistemov za imunomagnetno ločevanje smo se odločili za uporabo »Diamond CD133 isolation« kita, ki omogoča dvostopenjsko ločevanje. V prvem koraku odstranimo vse linijsko usmerjene celice, v drugem pa izoliramo CD133 pozitivne celice. V tem primeru bi lahko brez uporabe ločevalnika fluorescenčno označenih celic izolirali populacijo, podobno VSEL. Tako bi se izognili možnosti kontaminacije v primeru, da bi nas zanimalo nadaljnje gojenje celic. Ločevalnik fluorescenčno označenih celic namreč ni popolnoma zaprt sistem, v katerem bi bila preprečena vsaka možnost okužbe. Nasprotno lahko imunomagnetno ločevanje celic opravimo v aseptičnih pogojih znotraj brezprašne komore ali v zaprtih avtomatiziranih sistemih. Pomanjkljivost metode pa je v tem, da ne vemo natančno, kakšno populacijo

dobimo po izolaciji, in moramo opraviti dodatne analize z uporabo drugih metod, kot na primer pretočne citometrije.

Vendar pa mešanica protiteles za linijsko selekcijo v kompletu za izolacijo CD133 pozitivnih celic ne vključuje protitelesa proti splošnemu označevalcu levkocitov CD45. Tako po izvedenih obeh stopnjah selekcije dobimo CD133+ Lin- populacijo, ki pa še vedno vsebuje CD45+ celice. CD45+ celice pa so med CD133+ Lin- celicami večinska populacija in predstavljajo 86% celic. To so večinoma KMC, ki za razliko od VSEL ne izražajo pluripotentnih označevalcev, so večje in imajo manjše razmerje med površino jedra in citoplazme in so neposredno povezane s tvorjenjem krvnih celic (Zuba-Surma in sod., 2010). Za preučevanje VSEL bi morali torej odstraniti CD45+ celice.

Ena izmed možnosti je, da bi pri koraku negativne selekcije odstranili tudi CD45+ celice in sicer tako, da bi v mešanico protiteles dodali biotinilirano protitelo anti-CD45. Vendar, da ne bi na eni strani prihajalo do nespecifičnih vezav ter na drugi do nezadostne ločbe, je protitelo potrebno dodati v ravno pravšnji koncentraciji. Za titracijo CD45 protiteles smo po opravljeni imunomagnetni selekciji preverjali prisotnost CD45+ celic s pretočnim citometrom. A si zaradi omejenega dostopa do biološkega materiala in količine reagentov, ki so nam bili na razpolago, nismo mogli privoščiti obsežnega poskusa. Zato smo poskus omejili na postopno ugotavljanje primerne koncentracije protitelesa anti-CD45 z uporabo manjšega začetnega števila celic in kolon z manjšo kapaciteto. Iz rezultatov poskusa (Preglednica 11) je razvidno, da smo iz 45,1% CD45+ celic, kolikor jih je prisotno po izolaciji linijsko neusmerjenih celic brez dodatka protitelesa, prišli na 2,6% že pri najmanjši koncentraciji (1 µg/ml) dodanega biotiniliranega protitelesa anti-CD45. Tako smo odstranili večino CD45+ celic iz frakcije linijsko neusmerjenih celic. Ob dodajanju protitelesa v večji koncentraciji, pa je količina CD45 pozitivnih celic ostajala na približno enakei ravni (Slika 7). Vendar zgolj iz teh rezultatov ne moremo sklepati, da je to optimalna koncentracija protitelesa, saj nismo ugotovili, pri kateri nižji koncentraciji bi začel odstotek CD45 pozitivnih celic naraščati. Tako, zaradi omejitev pri količini razpoložljivih reagentov in dostopnosti do biološkega materiala, dejansko nismo uspeli določiti tiste mejne vrednosti, pri kateri bi ob najmanjšem dodatku protitelesa še dosegli dovolj učinkovito ločbo CD45 pozitivnih celic. Iz deleža izoliranih celic glede na začetno število celic je razvidno (Preglednica 11), da frakcija linijsko neusmerjenih celic predstavlja 7,35% vseh MNC v popkovnični krvi. Pričakovan delež linijsko neusmerjenih celic je okoli 3%, in sicer določen s pretočno citometrijo (Zuba-Surma in Ratajczak, 2010). Ob dodatku protitelesa anti-CD45 pa je ta delež padel pod 0,45%. To predstavlja velike izgube pri izolaciji linijsko neusmerjenih CD45 negativnih celic. Nekatere omejitve pri interpretaciji rezultatov tega poskusa izhajajo iz dejstva, da smo za titracijo protitelesa uporabili kolone z manjšo kapaciteto kot tiste, ki smo jih kasneje uporabili za ločevanje večje količine celic. Tako lahko že zaradi prehoda na večje merilo pride do odstopanj od prikazanih rezultatov. Iz rezultata pri vzorcu PK2 je razvidno, da smo sicer uspešno odstranili CD45 pozitivne celice tudi pri uporabi kolon z večjo kapaciteto in izolirali tudi primerljiv delež celic (0,13%) glede na začetno število celic. Statistična obdelava podatkov ni smiselna glede na to, da sta bila uporabljena zgolj dva vzorca, in še to z različnimi koncentracijami dodanega protitelesa. Zaradi navedenih razlogov je potrebno te rezultate jemati s pridržkom.

Nato smo hoteli preveriti, koliko matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi, oziroma v našem primeru CD133+ in hkrati CD45- celic, vsebujejo frakcije popkovnične krvi

pridobljene z različnimi metodami selekcije celic. Poleg označevalcev CD133 in CD45, ki širše definirata populacijo VSEL celic, smo določali tudi izražanje označevalca SSEA-4, ki je bolj neposredno povezan s pluripotentnimi matičnimi celicami. Na tej stopnji pri analizi na pretočnem citometru nismo uporabili protiteles proti linijsko usmerjenim celicam, zato je neposredna primerjava z literaturo o VSEL omejena, v določenih primerih pa vendarle možna. Za analizo smo uporabili dve frakciji popkovnične krvi, pri katerih z različnimi pristopoma izoliramo populacijo jedrnih celic. V primeru izolacije TNC uporabimo lizo eritrocitov, pri kateri naj bi prišlo do najmanjših izgub VSEL celic (Zuba-Surma in sod., 2010). V primeru izolacije MNC uporabimo gradientno centrifugiranje, pri uporabi katerega pa naj bi izgubili tudi do polovico VSEL (Zuba-Surma in sod., 2010), a se hkrati že na začetku znebimo tudi odvečnih granulocitov. Iz frakcije MNC smo z imunomagnetno selekcijo izolirali nadaljnji dve frakciji celic. Eno smo dobili z izolacijo linijsko neusmerjenih celic z uporabo »Diamond CD133 isolation kit« po protokolu proizvajalca. Drugo pa z izolacijo linijsko neusmerjenih in CD45 negativnih celic tako, da smo osnovnemu koktajlu iz prej omenjenega kompleta dodali biotinitirano protitelo anti-CD45.

Pred analizo izoliranih frakcij smo morali na grafu FSC/SSC določiti območje, kjer se naj bi nahajale iskane celice. Ker so CD133 pozitivne VSEL celice velike le okoli 6,75 μm je potrebno to območje vključiti v analizo na pretočnem citometru, saj se po navadi predpostavlja, da se tam nahajajo zgolj ostanki celic. V ta namen se lahko uporabi delce znanih velikosti in določi območje, ki zajema delce, večje od 2 μm (Zuba-Surma in Ratajczak, 2010). Mi smo za referenco uporabili trombocite, ki so najmanjši celični fragmenti v krvi. Iz rezultatov je razvidno (Slika 9), da na ta način določeno območje vsebuje večino trombocitov.

Na primeru rezultatov (Slika 10) iz analizirane frakcije MNC iz popkovnične krvi je razvidno, kako smo določili območja kjer se nahajajo posamezne populacije celic. Na grafu c sta lepo vidni populacija CD133+, CD45- celic, v kateri se nahajajo tudi VSEL ter populacija CD133+, CD45+ celic, ki vsebuje KMC. Oblika populacije CD133+, CD45+ celic je skladna s podatki iz literature, medtem ko je populacija CD133+, CD45- celic v našem primeru veliko bolj homogena (Zuba-Surma in sod., 2010). Iz grafov d in e je razvidno, da je v popkovnični krvi prisotna tudi populacija CD45-, SSEA-4+ celic, ki so v nekaterih primerih pozitivne tudi za CD133. Tako smo v popkovnični krvi identificirali tudi najbolj primitivno populacijo VSEL. Na grafu e je razvidno, da populaciji CD133+, CD45- celic in CD133+, SSEA-4+, CD45- celic nista homogeni, ampak ju predstavljajo celice različne granuliranosti in velikosti. Tudi to se sklada s podatki iz literature (Kucia in sod., 2007a). Če te populacije celic primerjamo z analizo nespecifičnih vezav za protitelesa proti CD133 in SSEA-4 (Slika 11), vidimo, da na teh območjih ni zaznati celic oziroma so prisotne v zelo majhnem številu, sliki 10 in 11 lahko neposredno primerjamo, saj prikazujeta enako število analiziranih celic. S primerjanjem grafov e na obeh slikah pa je razvidno, da se pri populaciji CD45+ celic vežejo v enaki meri tako specifično protitelo anti-SSEA-4 kot tudi nespecifična protitelesa istega tipa (IgG3). To je tudi razvidno iz podatkov (Preglednica 14), kjer so pri populaciji SSEA-4+, CD45+ celic vrednosti zaradi nespecifičnih vezav negativne. Zaradi tega smo to populacijo izključili iz nadaljnjih analiz.

Rezultati deležev različnih populacij v frakcijah popkovnične krvi, ki upoštevajo tudi nespecifične vezave protiteles, so zbrani v preglednici 14. Če primerjamo vsebnosti populacij CD133+ CD45- celic, SSEA-4+ CD45- celic in SSEA-4+ CD133+ CD45- celic med frakcijama TNC in MNC (Slika 12), vidimo, da se v obeh nahajajo v podobnih

odstotkih. To je vsaj za populacijo CD133+ CD45- celic primerljivo z ugotovitvami iz literature, ki kažejo da se koncentracija VSEL v frakcijah TNC in MNC statistično ne razlikuje (Zuba-Surma in sod., 2010). Le populacija CD133+ CD45+ celic je v TNC bistveno manjša. Ta razlika je prav tako razvidna iz literature (Zuba-Surma in sod., 2010). Populacije v frakciji MNC si po deležu sledijo v pričakovanem vrstnem redu, in sicer: populacija CD133+ CD45+ celic je najštevilnejša, sledijo ji malo manj številna populacija CD133+ CD45- celic, še manjša populacija SSEA-4+ CD45- celic in najmanjša populacija SSEA-4+ CD133+ CD45- celic. Pri TNC je vrstni red podoben, le da je populacija CD133+ CD45+ celic izven pričakovanih in je približno enako številna kot najmanjša populacija SSEA-4+ CD133+ CD45- celic.

V frakcijah po imunomagnetni selekciji smo odstranili linijsko usmerjene celice in se tako približali v literaturi uporabljenemu pristopu za identifikacijo VSEL, kjer linijsko usmerjene celice odstranijo pri analizi na pretočnem citometru (Kucia in sod., 2007a). Mi pa smo predpostavili, da je bila imunomagnetna selekcija tako učinkovita, da se v frakciji ne nahajajo linijsko usmerjene celice. Deleži prav vseh obravnavanih populacij v prejšnjem odstavku so se v frakcijah po imunomagnetni selekciji povečali, kar pomeni, da smo s tem korakom uspešno obogatili populacije celic, ki nas zanimajo. Populacijo CD133+, CD45- celic smo v frakciji Lin- celic v primerjavi z MNC povečali za okoli 100-krat, v frakciji Lin-, CD45- celic pa še za približno 2-krat več. Podobno smo populacijo SSEA4+, CD133+, CD45- celic v frakciji Lin- celic v primerjavi z MNC povečali za okoli 85-krat, v frakciji Lin-, CD45- celic pa še za približno 2-krat več.

V frakciji Lin- je bil delež CD45+ celic in CD45- celic med populacijo CD133+ celic enak (Slika 13), kar je v nasprotju s podatki iz literature, ki navajajo 86-% delež CD45+ celic (Zuba-Surma in sod., 2010). Ta razhajanja so verjetno posledica dejstva, da pri analizi na pretočnem citometru celic nismo označili proti označevalcem, značilnih za linijsko usmerjene celice, a smo zgolj predpostavili, da se v Lin- frakciji linijsko usmerjene celice ne nahajajo. Zanimivo je, da sta izenačeni tudi populaciji SSEA-4+, CD45- celic in SSEA-4+, CD133+, CD45- celic, kar pomeni, da v Lin- frakciji skoraj vse SSEA-4+, CD45- celice izražajo tudi CD133. To kaže na to, da je v frakciji Lin- celic označevalec CD133 prisoten na večini SSEA-4+, CD45- celic. Po pričakovanjih je obeh populacij CD133+ celic več kot populacije SSEA-4+ CD45- celic. Z imunomagnetno selekcijo, s katero smo odstranili poleg linijsko usmerjenih celic tudi CD45+ celice, smo še dodatno obogatili populacije, ki bi lahko predstavljale VSEL celice. Vsi deleži obravnavanih CD45- populacij so se namreč povečali. In tudi razmerje med SSEA-4+ CD45- celicami in SSEA-4+ CD133+ CD45- celicami ostaja nespremenjeno. Kot smo pričakovali, pa smo odstranili del CD133+ CD45+ celic, saj se njihov delež v frakciji Lin-, CD45- zmanjša. Vendar je bila učinkovitost odstranitve CD45+ celic slabša od pričakovane. Če pogledamo celotno populacijo celic v tej frakciji, vidimo, da nam v njej ostane še 27% CD45+ celic. Ta neučinkovitost je lahko posledica nepričakovano visokega deleža CD45+ celic (75%), ki ga dobimo po odstranitvi samo linijsko usmerjenih celic, in je v prejšnjih poskusih znašal 45%. Ne vemo, ali je tovrstna razlika posledica razlik med biološkimi vzorci ali napak pri izvedbi poskusa. Kakorkoli, tovrstno opažanje nam kaže, da bi z uporabo druge stopnje imunomagnetne selekcije na CD133+ celice v izolirani frakciji bile prisotne tudi CD45+ celice in tako ne bi pridobili zgolj čiste populacije VSEL celic. Med njimi bi bilo še vedno 22% CD45+ celic, kolikor znaša delež CD133+ CD45+ celic med populacijo CD133+ celic v frakciji Lin-, CD45-.

Če bi sklepali samo iz podatkov o deležu populacij, bi lahko zaključili, da je uporaba imunomagnetne selekcije za izolacijo matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi zelo primerna. Z njo namreč v veliki meri obogatimo populacijo VSEL celic v izoliranih frakcijah celic iz popkovnične krvi. Vendar pa pri tem ne upoštevamo izgub, ki nastanejo pri postopkih imunomagnetne izolacije. Zato smo najprej izračunali, koliko celic lahko z uporabo določene metode pridobimo iz 1 ml popkovnične krvi (Preglednica 12). Pri tem izračunu smo predpostavili, da med začetnim številom celic in številom izoliranih celic obstaja linearna korelacija. Iz rezultatov je vidno, da največ celic pridobimo pri frakciji MNC, kar se ne sklada s pričakovanji, da pri izolaciji TNC dobimo največje število celic (Zuba-Surma in sod., 2010). Ta rezultat bi bil lahko posledica dejstva, da smo za izolacijo TNC uporabili zgolj 2,7 ml popkovnične krvi, medtem ko smo za izolacijo MNC uporabili 64 ml. Možno je, da bi bila učinkovitost izolacije TNC pri uporabljenih večjih volumnih popkovnične krvi večja in da zgornja predpostavka o linearni korelaciji med začetnim številom in številom izoliranih celic ni pravilna. Podatki, ki se nanašajo na TNC, zaradi teh nepričakovanih odstopanj, najverjetneje ne predstavljajo dejanskega stanja. V primerjavi z izolacijo MNC, lahko z imunomagnetno selekcijo linijsko neusmerjenih celic iz 1 ml popkovnične krvi izoliramo okoli 330-krat manjše število celic. Ob odstranjevanju celic pozitivnih tudi za CD45, pa je število izoliranih celic še okoli 12-krat manjše.

Če upoštevamo število celic, ki jih z uporabo različnih metod izolacije pridobimo iz 1 ml popkovnične krvi, in delež populacije celic, ki se nahaja znotraj teh frakcij, lahko izračunamo, kolikšno število določenih celic lahko s posameznim načinom izolacije pridobimo iz 1 ml popkovnične krvi (Preglednica 15). Pri tem izračunu smo predpostavili, da vsi analizirani dogodki s pretočnim citometrom predstavljajo celice in ne tudi ostankov celic ali ostalih delcev, ki lahko motijo analizo. Na podlagi tega izračuna lahko zato zgolj ocenimo primernost določene metode za izolacijo matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi. Iz rezultatov je razvidno (Slika 14), da so v 1 ml popkovnične krvi vse štiri obravnavane populacije celic (CD133+, CD45- celice, CD133+, CD45+ celice, SSEA-4+, CD45- celice in SSEA-4+, CD133+, CD45- celice) v največjem številu prisotne v frakciji MNC. Manjše število obravnavanih populacij je prisotno v frakciji TNC, kar sicer ni v skladu s pričakovanji in je najverjetneje posledica zgoraj komentiranih odstopanj, ki so nastale zaradi načina izolacije TNC. Populacija CD133+, CD45- je tako celo manj številna kot v frakciji Lin-. V Lin- frakciji so vse ostale obravnavane populacije celic v 1 ml popkovnične krvi prisotne v manjšem številu kot v frakcijah MNC in TNC. Pri frakciji Lin- CD45- pa je ta razlika še večja, saj kažejo najmanjše vrednosti.

Vendar če med frakcijama MNC in Lin- primerjamo vsebnost za nas najbolj zanimivih populacij CD133+, CD45- celic in SSEA-4+, CD133+, CD45- celic v 1 ml popkovnične krvi, vidimo, da je ta pri frakciji Lin- za približno 3-krat manjša. To pomeni, da bi potrebovali za izolacijo enakega števila VSEL celic iz frakcije Lin- celic 3-krat več popkovnične krvi kot pri izolaciji neposredno iz frakcije MNC. A ker imunomagnetna selekcija v primerjavi s FACS v enakem časovnem obdobju omogoča izolacijo veliko večjega števila celic, lahko to razliko z vidika porabe časa nadoknadimo (Zuba-Surma in Ratajczak, 2010). Tako je pri večjih vzorcih popkovnične krvi smiselno najprej uporabiti imunomagnetno selekcijo, s katero odstranimo veliko večino nezaželenih celic, in nato iz te maloštevilne, a obogatene frakcije Lin- celic z uporabo FACS izolirati dovolj čisto populacijo matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi. S tem lahko čas, ki ga porabimo za izolacijo teh celic, skrajšamo z več dni na zgolj 5 do 6 ur. Poleg tega porabimo tudi manj

reagentov za FACS, ki so dražji v primerjavi s tistimi za imunomagnetno selekcijo (Zuba-Surma in Ratajczak, 2010). Pri izolaciji Lin⁻, CD45⁻ frakcije celic le to sicer še bolj obogatimo s populacijo matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi, vendar so na drugi strani prisotne še večje izgube (20-kratne v primerjavi z MNC). In glede na to, da lahko že samo z odstranjevanjem Lin⁺ celic učinkovito skrajšamo čas izolacije večjega števila matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi, dodatno odstranjevanje CD45⁺ celic z imunomagnetno selekcijo ni potrebno. Še posebej, če imamo pri tem koraku dodatne izgube. Poudariti je treba, da so to podatki pridobljeni zgolj iz enega vzorca, zato kakršnakoli statistična obdelava ni smiselna. Zato moramo biti pri interpretaciji takšnih podatkov zelo zadržani. Nekatere omejitve izhajajo tudi iz dejstva, da analiza vsebnosti matičnih celic ni vključevala vseh potrebnih elementov. Če primerjamo podatek, da je v 1 ml približno 1700 CD133⁺ CD45⁻ celic (domnevno VSEL) z znanimi podatki (okoli 500 celic na 1 ml popkovnične krvi (Zuba-Surma in sod., 2010)), vidimo, da smo precenili vsebnost VSEL v frakciji MNC. To je lahko posledica dejstva, da pri analizi na pretočnem citometru nismo upoštevali linijskih označevalcev in smo tako razširili populacijo, v katero smo uvrstili VSEL celice.

Ker smo ugotovil, da lahko v vzorcih popkovnične krvi identificiramo populacijo matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi (VSEL), smo se odločili, da poskusimo z njihovo izolacijo v treh korakih. Čeprav smo v prejšnjem poskusu ugotovili, da je v frakciji MNC prisotnih največ VSEL, smo se zaradi pomislekov glede pridobljenih rezultatov, težav pri uspešnosti ločevanja z gradientnim centrifugiranjem (neobjavljeni podatki) in podatkov iz literature (Zuba-Surma in sod., 2010) odločili raje za izolacijo TNC z lizo eritrocitov. Iz teh smo nato z imunomagnetno selekcijo izolirali linijsko neusmerjene celice ter nato z ločevalnikom fluorescenčno označenih celic izolirali še populacijo CD133⁺, CD45⁻, Lin⁻ celic. Zaradi pomislekov, opisanih v prejšnjem odstavku, smo celice za ločevanje poleg s protitelesi proti CD133, CD45 in SSEA-4 označili tudi z biotiniliranimi protitelesi proti linijsko usmerjenim celicam iz kompleta za imunomagnetno ločevanje »Diamond CD133 isolation kit«. Na ta protitelesa smo vezali sekundarna označena protitelesa proti biotinu. Uporaba sistema primarnih neoznačenih in sekundarnih označenih protiteles zaradi povečanih nespecifičnih vezav sicer ni priporočljiva (Zuba-Surma in Ratajczak, 2010). Vendar bi morali v primeru uporabe konjugiranih protiteles sami sestaviti mešanico protiteles proti linijskim označevalcem, saj na tržišču ni na voljo koktajla ustreznih protiteles. To pa bi pomenilo, da bi morali kupiti 9 specifičnih protiteles, kar bi predstavljalo velik strošek. Zato smo se raje odločili za uporabo omenjenega pristopa.

Pri analizi s pretočnim citometrom je bilo določanje območij, kjer se nahajajo določene populacije celic (Slika 15), zelo podobno kot v prejšnjem primeru (Slika 10), le da so tokrat z barvilom FITC označene tako CD45⁺ celice kot tudi Lin⁺ celice. Oblika grafov in populacij je pri obeh pristopih podobna. Le na grafu b (Slika 15) je tokrat vidno, da je označena velika večina celic in je le 1,8% celic CD45⁻ Lin⁻. Ker smo označili hkrati tako Lin⁺ kot tudi CD45⁺ celice rezultata ne moremo primerjati s podatki iz literature, kjer so bile omenjene populacije celic označene z različnimi barvili in so določili, da je okoli 3% celic Lin⁻ (Zuba-Surma in Ratajczak, 2010). Je pa rezultat vsekakor smiseln glede na to, da smo označili večjo populacijo celic. Pri primerjavi deležev različnih populacij v frakciji TNC (Preglednica 17), ki jih lahko primerjamo z literaturo, ugotovimo, da so rezultati podobni. Populacija CD133⁺ CD45⁻ Lin⁻ predstavlja 0,019% vseh TNC celic, v literaturi je ta delež 0,012%. Populacija SSEA-4⁺ CD133⁺ CD45⁻ Lin⁻ predstavlja 0,004%, v

literaturi je ta delež 0,0016% (Zuba-Surma in sod., 2010). Če naredimo relativno primerjavo sicer vidimo, da so naše vrednosti 1,5-krat oziroma 2,5-krat večje. Sklepamo lahko, da smo v popkovnični krvi uspešno identificirali populacijo matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi.

Pri pregledu ostalih podatkov, za katere v literaturi ni podatka, vidimo, da so vrednosti znotraj pričakovanih. V nasprotju s prejšnjim poskusom je vidna veliko večja razlika med deležem SSEA-4+ CD45- celic in SSEA-4+ CD45+ celic. Opozoriti velja le, da je pri populacijah SSEA-4+ celic in SSEA-4+ CD45+ celic velik odstotek nespecifičnih vezav (77%) in da rezultati niso zanesljivi. Če pogledamo rezultate po imunomagnetni selekciji, vidimo, da je pri večini rezultatov odstotek nespecifičnih vezav večji od 90%, kar kaže na nezanesljivost meritev. V primerih populacij CD133+ CD45- Lin- celic in SSEA-4+ CD133+ CD45+ Lin- celic, ki nas najbolj zanimajo, so nespecifične vezave celo večje od specifičnih. Prisotnost velikega števila nespecifičnih vezav je vidna tudi na rezultatih analize s pretočnim citometrom (Slika 18). Edini rezultati, ki so bolj zanesljivi, so tisti o populacijah CD133+ celic in CD133+, CD45+ celic, ki predstavljajo 3,2% celotne Lin-frakcije. Zanimivo je, da je v celotni frakciji Lin- celic samo 1,8% Lin-, CD45- celic. To je zelo malo, glede na to, da naj bi bila to populacija linijsko neusmerjenih celic. Tudi primerjava s TNC frakcijo nam kaže, da smo po imunomagnetni selekciji zgolj za 1,3-krat povečali vsebnost Lin- CD45- populacije celic. Iz tega bi lahko sicer sklepali, da je bilo kaj narobe pri postopku imunomagnetne selekcije, vendar je to malo verjetno glede na to, da smo po odstranitvi Lin+ celic iz okoli 166 milijonov celic dobili le 2,32 milijona celic (1,4%), kar ne odstopa mnogo od pričakovanih 3% (Zuba-Surma in sod., 2010). Bolj verjetno je, da uporabljena metoda označevanja linijsko usmerjenih celic, ki smo jo uporabili pri analizi s pretočnim citometrom, ni povsem primerna. To nakazujejo tudi večji odstotki nespecifičnih vezav pri frakciji Lin- celic. Po drugi strani pa pri analizi frakcije TNC ni bilo večjih nespecifičnih vezav, razen pri populaciji SSEA-4+, CD45+ celic, ki je tudi pri prvi analizi brez označevanja linijsko usmerjenih celic kazala podobne rezultate. Tudi rezultati so pri frakciji TNC so primerljivi s tistimi v literaturi. Tako so nespecifične vezave pri analizi s pretočnim citometrom nekako povezane s postopkom predhodne imunomagnetne selekcije. Morda je v tako izolirani populaciji večja vsebnost razpadlih celic in drugih delcev, ki moti analizo s pretočnim citometrom.

Uporaba imunomagnetne selekcije kot vmesne stopnje celic nam daje različne rezultate. V primeru analize populacij celic v različnih frakcijah popkovnične krvi smo uspeli pokazati, da je odstranjevanje Lin+ celic učinkovit korak za izolacijo večjega števila celic. V primeru poskusa izolacije s FACS pa ne moremo z gotovostjo trditi, da se v izoliranem vzorcu nahajajo matične celice z embrionalnimi lastnostmi. Glede na populacijo TNC namreč vidimo, da popkovnična kri vsebuje te celice. Tudi po imunomagnetni selekciji je vidna populacija CD133+, Lin-, CD45- celic, vendar to opažanje zaradi velikih nespecifičnih vezav sicer ni najbolj zanesljivo. Tako je možno, da se v vzorcu med 345 izoliranimi celicami s FACS vseeno nahajajo matične celice z embrionalnimi lastnostmi, a bi morali njihovo prisotnost potrditi najprej z molekularnimi metodami in nato še preveriti njihov diferenciacijski potencial *in vitro* ter ob pozitivnih rezultatih tudi *in vivo*. To število celic, ki smo jih pridobili iz 50 ml popkovnične krvi, je veliko manjše od 10000 do 20000 celic, kolikor jih je možno izolirati iz podobne količine popkovnične krvi sodeč po navedbah iz literature (Zuba-Surma in Ratajczak, 2010). Kar kaže, da bi bilo potrebno

preveriti ustreznost takšnega pristopa z dodatnimi poskusi in nadaljnje optimizirati metodo izolacije.

V prihodnje je torej potrebno poskuse ponoviti v večjem obsegu, da bi lahko ocenili zanesljivost in ponovljivost rezultatov. Postopek izolacije matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi je potrebno še dodatno optimizirati, da bo omogočal pridobitev večjega števila celic. Njihovo prisotnost v izoliranih vzorcih pa je potrebno potrditi s preverjanjem izražanja embrionalnih označevalcev na ravni mRNA ter nadaljnje potrditi njihovo pluripotentnost s poskusi diferenciacije *in vitro* ter *in vivo*.

5.2 SKLEPI

- V popkovnični krvi smo identificirali matične celice z embrionalnimi lastnostmi, ki so definirane kot populacija celic, pozitivna za označevalec CD133, negativna za označevalec CD45 in negativna za označevalce linijsko usmerjenih celic.
- Identificirali smo tudi populacijo matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi, ki izraža tudi označevalec embrionalnih matičnih celic SSEA-4.
- Z odstranjevanjem linijsko usmerjenih celic preko imunomagnetne selekcije smo v frakciji izoliranih celic uspeli povečati delež populacije celic, pozitivnih za CD133 in SSEA-4 ter negativnih za CD45. Njihovo vsebnost smo uspeli še dodatno povečati z imunomagnetnim odstranjevanjem linijsko usmerjenih in CD45 pozitivnih celic.
- Metode izolacije z uporabo kita »Diamond CD133 isolation kit« in dodatkom biotiniliranega protitelesa proti označevalcu CD45 nismo uspeli optimizirati v takšni meri, da bi lahko samo z imunomagnetno selekcijo izolirali čisto populacijo matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi.
- Z izolacijo TNC, uporabo imunomagnetne selekcije in ločevalnika fluorescenčno označenih celic smo sicer izolirali CD133+ CD45- Lin- celice, vendar pa bi morali z dodatnimi metodami preveriti prisotnost celic z embrionalnimi lastnostmi v izolirani populaciji.

6 POVZETEK

Odraslo človeško telo je sestavljeno iz več kot 200 različnih tipov celic, ki tvorijo različna tkiva in organe ter tako zagotavljajo vse potrebne funkcije za življenje. Vendar se večina celic v telesu ni sposobna podvojevati na način, da bi lahko nadomestile mrtve ali poškodovane celice ter tako ohranjale funkcionalnost tkiva. To funkcijo v večini opravlja majhno število matičnih celic, ki so v procesu samoobnavljanja sposobne z asimetričnimi celičnimi delitvami tvoriti sebi enake celice na eni in hčerinske celice na drugi strani. Te se nato diferencirajo v specifične tipe celic.

Največji diferenciacijski potencial imajo embrionalne matične celice, ki jih lahko izoliramo iz zgodnjih stopenj razvoja zarodka, saj se lahko razvijejo v vse tipe celic. Embrionalne matične celice zaradi svojih diferenciacijskih in proliferacijskih sposobnosti ponujajo mnoge možnosti za uporabo v regenerativni medicini. Vendar imajo zaradi potencialne tumorigenosti in alogenskega izvora tudi omejitve. V zadnjem času so bile v odraslih tkivih odkrite tudi maloštevilne matične celice, ki izražajo označevalce, značilne za embrionalne matične celice. V zgodnjem embrionalnem razvoju naj bi se namreč izognile linijski usmeritvi in ohranile velik diferenciacijski potencial. Tako bi lahko predstavljale avtologen vir celic, ki bi bil široko uporaben v regenerativni medicini. Takšne matične celice z embrionalnimi lastnostmi so bile odkrite tudi v popkovnični krvi, ki velja za enega najlažje dostopnih virov matičnih celic.

Matične celice, ki izražajo označevalce embrionalnih matičnih celic Oct-4, Nanog in SSEA-4, se v popkovnični krvi nahajajo v zelo majhnem številu in predstavljajo le 0,04% vseh jedrnih celic, zaradi česar je njihova izolacija zelo zahtevna. Populacija matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi izraža površinske označevalce CD133, CD184 in CD34 in ne izraža označevalcev, značilnih za linijsko usmerjene celice (CD19, CD2, CD3, CD14, CD66b, CD24, CD16, CD56, CD235a,) in skupnega označevalca vseh levkocitov (CD45). Izmed vseh so najbolj primitivne tiste, ki izražajo CD133, saj so najmanjše, imajo največje razmerje površino jedra in citoplazme ter tudi v največji meri izražajo pluripotentne označevalce.

V diplomskem delu smo želeli v vzorcih popkovnične krvi z analizo na pretočnem citometru identificirati populacijo matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi, in oceniti primernost metod za njihovo izolacijo. V popkovnični krvi smo s pretočnim citometrom potrdili prisotnost populacije matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi, pozitivnih za CD133 ter negativnih za CD45 in označevalce linijsko usmerjenih celic. Poleg tega smo znotraj te populacije identificirali tudi celice, ki izražajo še označevalec, značilen za embrionalne matične celice SSEA-4. Z odstranjevanjem linijsko usmerjenih celic preko imunomagnetne selekcije smo v frakciji izoliranih celic uspeli povečati delež populacije celic pozitivnih za CD133 in SSEA-4 ter negativnih za CD45. Njihovo vsebnost smo uspeli še dodatno povečati z imunomagnetnim odstranjevanjem linijsko usmerjenih in CD45 pozitivnih celic.

Uporaba FACS je ključen korak pri izolaciji populacij matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi, saj zagotavlja relativno dobro čistost končnih populacij. Matične celice z embrionalnimi lastnostmi smo poskusili izolirati v treh korakih. Najprej smo z lizo eritrocitov izolirali TNC, nato smo z imunomagnetno selekcijo odstranili linijsko usmerjene celice ter nato z uporabo FACS izolirali populacijo celic pozitivnih, za CD133 in negativnih za CD45 ter označevalce linijsko usmerjenih celic, vendar pa bi morali z

dodatnimi metodami preveriti prisotnost celic z embrionalnimi lastnostmi v izolirani populaciji.

V popkovnični krvi se torej nahaja populacija matičnih celic z embrionalnimi lastnostmi, ki ima velik potencial za uporabo v regenerativni medicini. V prihodnje je potrebno še dodatno optimizirati postopke za njihovo izolacijo, preveriti izražanje embrionalnih označevalcev na ravni mRNA in preveriti njihov diferenciacijski potencial *in vitro* in *in vivo*.

7 VIRI

- Bang A.G., Carpenter M.K. 2009. Characteristics and Characterization of Human Pluripotent Stem Cells. V: *Essentials of Stem Cell Biology*. Second Edition. Lanza R., Gearhart J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomas E.D., Thomson J., Wilmut S.I. (ur.). San Diego, Academic Press: 339-343
- Battula V.L., Bareiss P.M., Treml S., Conrad S., Albert I., Hojak S., Abele H., Schewe B., Just L., Skutella T., Buhning H.J. 2007. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation*, 75, 4: 279-291
- Beltrami A.P., Cesselli D., Bergamin N., Marcon P., Rigo S., Puppato E., D'Aurizio F., Verardo R., Piazza S., Pignatelli A., Poz A., Baccarani U., Damiani D., Fanin R., Mariuzzi L., Finato N., Masolini P., Burelli S., Belluzzi O., Schneider C., Beltrami C.A. 2007. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood*, 110, 9: 3438-3446
- Berg J.S., Goodell M.A. 2007. An Argument against a Role for Oct4 in Somatic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 1, 4: 359-360
- BD Bioscience. BD CompBead Plus. 2010. BD Bioscience: 2 str. (Navodilo za uporabo)
- Brons I.G., Smithers L.E., Trotter M.W., Rugg-Gunn P., Sun B., Chuva de Sousa Lopes S.M., Howlett S.K., Clarkson A., Ahrlund-Richter L., Pedersen R.A., Vallier L. 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, 448, 7150: 191-195
- D'Ippolito G., Diabira S., Howard G.A., Menei P., Roos B.A., Schiller P.C. 2004. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *Journal of Cell Science*, 117, 14: 2971-2981
- Darovanje popkovnične krvi. 2010. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. http://www.ztm.si/sl/register_darovalcev_kmc/darovanje_popkovnicne_krvi/ (2. sep. 2010)
- De-Miguel M.P., Arnalich-Montiel F., Lopez-Iglesias P., Blazquez-Martinez A., Nistal M. 2009. Epiblast-derived stem cells in embryonic and adult tissues. *International Journal of Developmental Biology*, 53, 8-10: 1529-1540
- Evans M.J., Kaufman M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 5819: 154-156
- GE Healthcare. Isolation of mononuclear cells, methodology and applications. 2007. GE Healthcare: 24 str. (Katalog)

- GE Healthcare. Ficoll-Paque PREMIUM. 2008. GE Healthcare: 16 str. (Navodilo za uporabo)
- Gilbert S.F. 2000. *Developmental Biology*. 6th Edition. Sunderland, Sinauer Associates, Inc.: 749 str. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=dbio> (2. sep. 2010)
- Guan K., Nayernia K., Maier L.S., Wagner S., Dressel R., Lee J.H., Nolte J., Wolf F., Li M., Engel W., Hasenfuss G. 2006. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 440, 7088: 1199-1203
- Jaenisch R., Young R. 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 132, 4: 567-582
- Jahagirdar B.N., Verfaillie C.M. 2005. Multipotent adult progenitor cell and stem cell plasticity. *Stem Cell Reviews*, 1, 1: 53-59
- Jiang Y.H., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J.B., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 6893: 41-49
- Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J., Yoshimoto M., Ogonuki N., Miki H., Baba S., Kato T., Kazuki Y., Toyokuni S., Toyoshima M., Niwa O., Oshimura M., Heike T., Nakahata T., Ishino F., Ogura A., Shinohara T. 2004. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*, 119, 7: 1001-1012
- Kos M., Bulog B. 1995. *Embriologija Vretenčarjev*. Navodila za vaje. Ljubljana, Študentska organizacija Univerze: 61 str.
- Kucia M., Halasa M., Wysoczynski M., Baskiewicz-Masiuk M., Moldenhawer S., Zuba-Surma E., Czajka R., Wojakowski W., Machalinski B., Ratajczak M.Z. 2007a. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia*, 21, 2: 297-303
- Kucia M., Machalinski B., Ratajczak M.Z. 2006a. The developmental deposition of epiblast/germ cell-line derived cells in various organs as a hypothetical explanation of stem cell plasticity? *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 66, 4: 331-341
- Kucia M., Reca R., Campbell F.R., Zuba-Surma E., Majka M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2006b. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4+SSEA-1+Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, 20, 5: 857-869
- Kucia M., Wu W., Ratajczak M.Z. 2007b. Bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells: Their developmental origin and biological significance. *Developmental Dynamics*, 236, 12: 3309-3320

- Kucia M.J., Wysoczynski M., Wu W., Zuba-Surma E.K., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2008. Evidence That Very Small Embryonic-Like Stem Cells Are Mobilized into Peripheral Blood. *Stem Cells*, 26, 8: 2083-2092
- Leeb C., Jurga M., McGuckin C., Moriggl R., Kenner L. 2010. Promising New Sources for Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 6, 1: 15-26
- Lengner C.J., Camargo F.D., Hochedlinger K., Welstead G.G., Zaidi S., Gokhale S., Scholer H.R., Tomilin A., Jaenisch R. 2007. Oct4 Expression Is Not Required for Mouse Somatic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell*, 1, 4: 403-415
- Liedtke S., Enczmann J., Waclawczyk S., Wernet P., Kögler G. 2007. Oct4 and Its Pseudogenes Confuse Stem Cell Research. *Cell Stem Cell*, 1, 4: 364-366
- Martin G.R. 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-Biological Sciences*, 78, 12: 7634-7638
- Matsui Y., Zsebo K., Hogan B.L. 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 70, 5: 841-847
- 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
- Melton D.A., Cowen C. 2009. "Stemness": Definitions, Criteria, and Standards. V: *Essentials of Stem Cell Biology*. Second Edition. Lanza R., Gearhart J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomas E.D., Thomson J., Wilmot S.I. (ur.). San Diego, Academic Press: XXIII-XXIX
- Miltenyi Biotech. Diamond CD133 isolation kit. 2010. Miltenyi Biotech: 4 str. (Navodilo za uporabo)
- Miltenyi Biotech. MACS Technology, Gold standard in cell separation. 2008. Miltenyi Biotech: 8 str. (Katalog)
- Niwa H. 2007. How is pluripotency determined and maintained? *Development*, 134, 4: 635-646
- Pernick N. 2010a. CD Markers CD1 to CD49. PathologyOutlines.com, Inc. (2. sep. 2010). <http://pathologyoutlines.com/cdmarkers.html> (5. sep. 2010)
- Pernick N. 2010b. CD Markers CD50 to CD99. PathologyOutlines.com, Inc. (3. sep. 2010). <http://pathologyoutlines.com/cd5099.html> (5. sep. 2010)

- Pernick N. 2010c. CD Markers CD100 to CD400. PathologyOutlines.com, Inc. (7. apr. 2010). <http://pathologyoutlines.com/cd100247.html> (5. sep. 2010)
- Phinney D.G., Prockop D.J. 2007. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair—Current Views. *Stem Cells*, 25, 11: 2896-2902
- Pochampally R.R., Smith J.R., Ylostalo J., Prockop D.J. 2004. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood*, 103, 5: 1647-1652
- Ratajczak M.Z., Machalinski B., Wojakowski W., Ratajczak J., Kucia M. 2007a. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4+ stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia*, 21, 5: 860-867
- Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Machalinski B., Kucia M. 2007b. Bone-marrow-derived stem cells - our key to longevity? *Journal of Applied Genetics*, 48, 4: 307-319
- Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Shin D.M., Ratajczak J., Kucia M. 2008a. Very small embryonic-like (VSEL) stem cells in adult organs and their potential role in rejuvenation of tissues and longevity. *Experimental Gerontology*, 43, 11: 1009-1017
- Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Wysoczynski M., Wan W., Ratajczak J., Wojakowski W., Kucia M. 2008b. Hunt for pluripotent stem cell -- regenerative medicine search for almighty cell. *Journal of Autoimmunity*, 30, 3: 151-162
- Resnick J.L., Bixler L.S., Cheng L., Donovan P.J. 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 359, 6395: 550-551
- Rossant J. 2008. Stem cells and early lineage development. *Cell*, 132, 4: 527-531
- Rožman P., Jež M. 2010. Matična celica in napredno zdravljenje (napredno zdravljenje s celicami, genska terapija in tkivno inženirstvo) - Slovar. DCTIS - Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije (20. maj 2010). http://www.dctis.org/terminoloski_koticek/SC_slovarcek_SLO20.pdf (10. sep. 2010)
- 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
- Seandel M., James D., Shmelkov S.V., Falciatori I., Kim J., Chavala S., Scherr D.S., Zhang F., Torres R., Gale N.W., Yancopoulos G.D., Murphy A., Valenzuela D.M., Hobbs R.M., Pandolfi P.P., Rafii S. 2007. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature*, 449, 7160: 346-350

- Shamblott M.J., Axelman J., Wang S.P., Bugg E.M., Littlefield J.W., Donovan P.J., Blumenthal P.D., Huggins G.R., Gearhart J.D. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 23: 13726-13731
- Shin D.M., Liu R., Klich I., Wu W., Ratajczak J., Kucia M., Ratajczak M.Z. 2010. Molecular signature of adult bone marrow-purified very small embryonic-like stem cells supports their developmental epiblast/germ line origin. *Leukemia*, 24, 8: 1450-1461
- Shin D.M., Zuba-Surma E.K., Wu W., Ratajczak J., Wysoczynski M., Ratajczak M.Z., Kucia M. 2009. Novel epigenetic mechanisms that control pluripotency and quiescence of adult bone marrow-derived Oct4(+) very small embryonic-like stem cells. *Leukemia*, 23, 11: 2042-2051
- Smith K.P., Luong M.X., Stein G.S. 2009. Pluripotency: Toward a gold standard for human ES and iPS cells. *Journal of Cellular Physiology*, 220, 1: 21-29
- 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
- Tarkowski A.K. 1959. Experiments on the Development of Isolated Blastomeres of Mouse Eggs. *Nature*, 184, 4695: 1286-1287
- Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A., Davies T.J., Evans E.P., Mack D.L., Gardner R.L., McKay R.D. 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, 448, 7150: 196-199
- 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, 5391: 1145-1147
- Virant-Klun I., Rozman P., Cvjeticanin B., Vrtacnik-Bokal E., Novakovic S., Rulicke T., Dovc P., Meden-Vrtovec H. 2009. Parthenogenetic Embryo-Like Structures in the Human Ovarian Surface Epithelium Cell Culture in Postmenopausal Women with No Naturally Present Follicles and Oocytes. *Stem Cells and Development*, 18, 1: 137-149
- Virant-Klun I., Zech N., Rozman P., Vogler A., Cvjeticanin B., Klemenc P., Malicev E., Meden-Vrtovec H. 2008. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation*, 76, 8: 843-856
- Wang X., Dai J.W. 2010. Concise Review: Isoforms of OCT4 Contribute to the Confusing Diversity in Stem Cell Biology. *Stem Cells*, 28, 5: 885-893
- Watt F.M., Driskell R.R. 2010. The therapeutic potential of stem cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 365, 1537: 155-163

- 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
- Wojakowski W., Tendera M., Kucia M., Zuba-Surma E., Paczkowska E., Ciosek J., Halasa M., Krol M., Kazmierski M., Buszman P., Ochala A., Ratajczak J., Machalinski B., Ratajczak M.Z. 2009. Mobilization of Bone Marrow-Derived Oct-4(+) SSEA-4(+) Very Small Embryonic-Like Stem Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 53, 1: 1-9
- Yu J., Thomson J.A. 2008. Pluripotent stem cell lines. *Genes & Development*, 22, 15: 1987-1997
- 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, II, Thomson J.A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 5858: 1917-1920
- Zuba-Surma E.K., Klich I., Greco N., Laughlin M.J., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2010. Optimization of isolation and further characterization of umbilical cord blood-derived very small embryonic/epiblast-like stem cells (VSELs). *European Journal of Haematology*, 84, 1: 34-46
- Zuba-Surma E.K., Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2009a. "Small Stem Cells" in Adult Tissues: Very Small Embryonic-Like Stem Cells Stand Up! *Cytometry Part A*, 75A, 1: 4-13
- Zuba-Surma E.K., Kucia M., Rui L., Shin D.-M., Wojakowski W., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2009. Fetal Liver Very Small Embryonic/Epiblast Like Stem Cells Follow Developmental Migratory Pathway of Hematopoietic Stem Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1176, 1: 205-218
- Zuba-Surma E.K., Ratajczak M.Z. 2010. Overview of Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSELs) and Methodology of Their Identification and Isolation by Flow Cytometric Methods. *Current Protocols in Cytometry*. 51: 9.29.1–9.29.15

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Miomirju Kneževiću, ker me je podrobneje seznanil s področjem regenerativne medicine in ponudil možnost opravljanja diplomskega dela na Zavodu RS za transfuzijsko medicino. Zahvaljujem se mu tudi za korekten pregled diplomskega dela in vse izrečene spodbudne besede.

Posebej se zahvaljujem somentorju izr. prof. dr. Primožu Rožmanu, ki mi je omogočil delo v svoji raziskovalni skupini ter mi izkazal zaupanje pri opravljanju raziskovalnega dela. Zahvaljujem se mu za izjemno korekten pregled diplomskega dela in nasvete v povezavi z njim.

Zahvala gre tudi recenzentu prof. dr. Petru Dovču za hiter in temeljit pregled diplomskega dela.

Zahvaljujem se predsednici komisije prof. dr. Branki Javornik za prilagodljivost glede oddaje diplomskega dela.

Da je oddaja diplomskega dela potekala brez dodatnih zapletov, se zahvaljujem gospe Nevenki Valič in gospe Ljubi Primožič Vrhovac.

Posebej se zahvaljujem dr. Elviri Maličev, ki mi je seznanila z delom na pretočnem citometru in si bila vedno pripravljena vzeti čas za diskusijo ter reševanje problemov glede eksperimentalnega dela. Zahvaljujem se ji tudi za vse nasvete glede diplomskega dela in stvari na sploh.

Zahvaljujem se Mojci Jež, ki me je uvedla v delo v celičnem laboratoriju. Zahvaljujem se ji za vse izkušnje, ki sem jih z njo pridobil pri eksperimentalnem delu in reševanju mnogih problemov. Zahvaljujem se ji tudi za vse nasvete in spodbude pri opravljanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se zaposlenim na Enoti za shranjevanje popkovnične krvi na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, ki so mi omogočili dostop do vzorcev popkovnične krvi.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, ki so mi bili pripravljeni pomagati pri marsikaterem problemu.

Zahvaljujem se Zavodu RS za transfuzijsko medicino, da sem lahko izvedel eksperimentalno delo.

Za hitro lektoriranje in nasvete glede diplomskega dela se zahvaljujem doc. dr. Zdravku Kobetu.

Zahvaljujem se staršem za zaupanje in podporo pri opravljanju študijskih obveznosti.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku tega diplomskega dela, še posebej hvala Ani in Jerneji.

V največji meri se zahvaljujem tebi, Sara, brez tvoje pomoči in spodbud v ključnih trenutkih mi nikoli ne bi uspelo dokončati tega diplomskega dela.

PRILOGE

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



IZJAVA O POUČENOSTI IN PRIVOLITEV ZA DAROVANJE POPKOVNIČNE KRVİ

Spodaj podpisana _____

rojena _____

prostovoljno izjavljam;

- da sem prejela, prebrala in razumela informacije o:
 - terapevtskem namenu in potrebi za darovanje popkovnične krvi,
 - odvzemu popkovnične krvi,
 - boleznih, ki se lahko prenesejo pri zdravljenju s popkovnično krvjo
 - posledicah in tveganju, povezanim z darovanjem,
 - varovanju osebnih podatkov,
 - potrebnih preiskavah in predvidenih postopkih pred odvzgom,
 - zdravljenju s tkivi / celicami,
 - preiskavah in predvidenih postopkih po odvzemu,
 - pravicah iz naslova zdravstvenega zavarovanja;
- da sem bila seznanjena z možnostjo:
 - da lahko kadar koli brez posledic odstopim od darovanja popkovnične krvi,
 - seznanitve z rezultati testiranj z razlago;
- da sem imel/a možnost zastaviti vprašanja;
- da so vsi podatki, ki sem jih navedel/a, resnični;

In soglašam:

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

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

Datum: _____ Podpis: _____

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

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

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